Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Einfluß verschiedener Vorbehandlungen auf die osteoinduktive Wirkung von Knochenmatrix und Knochengelatine

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Birgitta Brölz, geb. Miltenberger
aus Waldshut

1982

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Einfluß verschiedener Vorbehandlungen auf die osteoinduktive Wirkung von Knochenmatrix und Knochengelatine

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Birgitta Brölz, geb. Miltenberger
aus Waldshut
1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. K. Voigt
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. K.-H. Schmidt
2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Veihelmann

Vorbemerkung

Ohne die große Hilfsbereitschaft und Kooperation, die ich von vielen Seiten erfahren habe, hätte sich die Arbeit nicht in so rascher Weise ausführen lassen.

Mein Dank gilt ganz besonders:

- Herrn Dr. Dr. K.-H. Schmidt für die Anregungen zur Durchführung der Versuche,

- Herrn Dr. F. Thielemann für die Einführung in die chirurgische Arbeitsmethodik und für seine Hilfe bei der histologischen Auswertung der Explantate,

- meinem Mann, Dipl.-Ing. Rainer Brölz, für seine Unterstützung und seine Ratschläge bei der Gestaltung der Abbildungen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0041

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungen 5
II. Begriffsbestimmungen 6

1. Einleitung 8
1.1 Osteoblastentheorie 8
1.2 Metaplastische Theorie 9
1.3 Hormontheorie 10
1.4 Kammermodell 11
1.5 Spezifische osteogenetische Substanzen 11

2. Literaturübersicht 13
2.1 Osteoinduktion 13
2.1.1. BIP 13
2.1.2. BMP und BMPase 14
2.1.2.1. Funktionelle Charakterisierung des BMP . 14
2.1.2.2. Biochemische Charakterisierung des BMP . 15
2.1.2.3. Charakterisierung der BMPase 16
2.1.3. Kammermodell 17
2.2 Chronologischer Ablauf der Osteogenese 18
2.3 Verschiedene osteogenetisch aktive Gewebe ... 19
2.3.1. Epitheliale Zellen 19
2.3.1.1. Uroepitheliale Zellen 19
2.3.1.2. Gallenblasenepithel 20
2.3.1.3. Amnionzellen 20
2.3.2. Knochen- und Dentingewebe 21
2.3.3. Sonstige Gewebe 23
2.4 Unspezifische Stimuli und Einflußfaktoren ... 23
2.4.1. Chemische Einflüsse 23
2.4.2. Physikalische Einflüsse 24
2.4.3. Sonstige Einflüsse 26
2.4.3.1. Immunologische Faktoren 26
2.4.3.2. Implantationsstelle 27
2.4.3.3. Art und Alter der Versuchstiere 28
2.4.3.4. Menge des Implantates und Größe der Implantatpartikel 28
2.5 AP als Maß der Knochenbildung 29

3. Problemstellung 30

4. Material und Methoden 31
4.1 Material 31
4.1.1. Tiere 31
4.1.2. Geräte 31
4.1.3. Chemikalien 32
4.1.4. Sonstiges 33
4.2 Methoden 34
4.2.1. Gewinnung der Röhrenknochendiaphysen und des Serums 35
4.2.2. Demineralisierung der Röhrenknochendiaphysen 35
4.2.3. Herstellung der BMG aus demineralisierter Knochenmatrix 36
4.2.4. Herstellung der gewünschten Partikelgröße 38
4.2.5. Kollagenaseandauung der lyophilisierten und gemahlenen BMG 38
4.2.5.1. Kollagenaseandauung von BMG kleiner 400 µm in Tris-HCl-Puffer 38
4.2.5.2. Kollagenaseandauung von BMG kleiner 400 µm und BMG zwischen 400 µm und 1000 µm in Hank's solution Elektrolytlösung 39
4.2.6. Vorbereitung der verschiedenen Implantate 40
4.2.6.1. Andauung demineralisierter Röhrenknochendiaphysen:
a) mit Rattenserum 40
b) mit Tyrode-Puffer 40
4.2.6.2. Säulenchromatographische Auftrennung von in Tris-HCl-Puffer mit Kollagenase angedauter BMG kleiner 400 µm 42
4.2.6.3. Lösungsversuch von in Tris-HCl-Puffer mit Kollagenase angedauter BMG kleiner 400 µm in aqua dest. 45
4.2.6.4. Weiterbehandlung der in Hank's solution-Elektrolytlösung mit Kollagenase angedauten BMG zwischen 400 µm und 1000 µm und BMG kleiner 400 µm 45
4.2.6.5. Bau der Millipore-Kammern 46

4.2.7. Operationstechnik 47
4.2.7.1. Narkose 47
4.2.7.2. Implantation 47
4.2.7.3. Explantation 49
4.2.8. Implantat-Serien 52
4.2.8.1. Serie 1 52
4.2.8.2. Serie 2 52
4.2.8.3. Serie 3 52
4.2.8.4. Serie 4 53
4.2.8.5. Serie 5 53
4.2.8.6. Serie 6 53
4.2.8.7. Serie 7 53
4.2.9. Auswertung der Explantate 54
4.2.9.1. Bestimmung der AP 54
4.2.9.2. Qualitativ radiologische Bestimmung des Calciumgehaltes 57
4.2.9.3. Histologie 57
4.2.9.3.1. Fixieren und Einbetten 57
4.2.9.3.2. Herstellung von Dünnschnitten 58
4.2.9.3.3. Ausbettung 59
4.2.9.3.4. Trichromfärbung nach Masson-Goldner . 59

5. Ergebnisse 61
5.1 Gewichtsverlauf bei der Bearbeitung der Röhrenknochendiaphysen 61
5.2 Ergebnisse der Serie 1 63
5.2.1. Bestimmung der AP 63
5.2.2. Qualitativ radiologische Calciumbestimmung 65
5.3 Ergebnisse der Serie 2 67
5.3.1. Säulenchromatographische Analyse der in Tris-HCl-Puffer mit Kollagenase angedauten BMG kleiner 400 µm 67
5.3.2. Aktivität der AP nach Explantation der gesammelten Fraktionen 69
5.4 Ergebnisse der Serie 3 69
5.4.1. Aktivität der AP der in Kammern implantierten BMG kleiner 400 µm 70
5.4.2. Aktivität der AP der ohne Kammern implantierten BMG kleiner 400 µm 70

5.5 Ergebnisse der Serie 4 71
5.5.1. Lösungsversuch in aqua dest. 72
5.5.2. Aktivität der AP der löslichen Fraktion . 72
5.5.3. Aktivität der AP der unlöslichen Fraktion 73
5.6 Ergebnisse der Serie 5 74
5.7 Ergebnisse der Serie 6 75
5.7.1. Aktivität der AP der in Kollagenase löslichen Fraktion 75
5.7.2. Aktivität der AP der in Kollagenase unlöslichen Fraktion 75
5.8 Ergebnisse der Serie 7 75
5.9 Übersicht über die Serien 76
5.10 Ergebnisse der histologischen Untersuchung 81

6. Diskussion 85

7. Zusammenfassung 92

8. Literaturverzeichnis 93

I. Abkürzungen

AP	: alkalische Phosphatase
Abb.	: Abbildung
BMG	: bone morphogenetic gelatine, Knochengelatine
BMP	: bone morphogenetic protein
EDTA	: Äthylendiamintetraessigsäure
FG	: Feuchtgewicht
HE	: Hämatoxylin-Eosin
MMA	: Methylmethacrylat
R.-L.	: Real-Lexikon der Medizin
Tab.	: Tabelle
TG	: Trockengewicht

II. Begriffsbestimmungen

BMG : Bone morphogenetic gelatine entsteht bei der Einwirkung von 8 molarem Lithiumchlorid auf die mit 0,6 normaler Salzsäure entkalkte Knochenmatrix (Urist et al., 1973).

BMP : Bone morphogenetic protein ist eine osteogenetische Komponente der Knochenmatrix, die eng mit kollagenen Fibrillen verbunden ist (Urist und Strates, 1971).

BMPase : neutrale Proteinase, welche BMP abbaut (Urist, 1973).

Dialyse : selektive Diffusion gelöster Teilchen durch eine semipermeable Membran (R.-L., Urban und Schwarzenberg Verlag München/Berlin/Wien 1966).

Differenzierung: Umwandlung von allgemeinen polyvalenten Strukturen und potentiellen Funktionen in spezialisierte (R.-L., s.o.).

Inducer, Induktor: Als Inducer werden diffusible, als Induktor nichtdiffusible chemische Substanzen verschiedenster Art bezeichnet, welche die Zell- bzw. Gewebsdifferenzierung omnipotenter Zellen oder Gewebe stimulieren (Urist und Strates, 1971).

Induktion : embryonale oder morphogenetische Auslösung eines Wachstums- oder Differenzierungsvorganges an einer bestimmten Zelle oder Zellgruppe durch Einwirkung einer bestimmten anderen Zelle oder Zellgruppe oder durch einen exogenen abiotischen, nach Art eines Reizes wirkenden Einfluß (R.-L., s.o.).

Implantat : lebensunfähiges, animales oder homologes oder aber künstliches, chemisches, stabiles Material (R.-L., s.o.).

Implantation : temporäres, evtl. relativ kurzfristiges Einbringen eines Implantates in einen Körper (R.-L., s.o.).

Metaplasie : Übergang eines reifen Gewebes in ein anderes, ebenfalls differenziertes Gewebe.

Osteogenese : Bildung bzw. Entwicklung von Knochengewebe (R.-L., s.o.).

Osteogenin : eine oder mehrere Substanzen, die die Knochenbildung steuern (Lacroix, 1945).

Osteoinduktion: zu Osteoblasten führende Induktion.

Osteoprogenitorzelle: Bindegewebszelle von relativ nichtspezialisierter Erscheinung (Young, 1962).

Transformation: grundlegende Veränderung der sichtbaren und biochemischen Eigenschaften von Zellen auf bestimmte Reize hin, z.B. bei der Implantation von Knochenmatrix. (Huggins et al., 1970)

Transplantat: durch Transplantation in den Organismus eingepflanzte Zellen, Gewebe oder Organe (R.-L., s.o.).

Transplantation: Einpflanzung lebender Zellen, Gewebe oder Organe an eine andere Stelle des gleichen Organismus oder in einen anderen

a) autogen: vom selben Individuum stammend (früher: autolog)

b) allogen: von einem anderen Individuum derselben Spezies stammend (früher: homolog)

c) xenogen: von einem Individuum einer anderen Spezies stammend (früher: heterolog).

1. Einleitung

1.1 Osteoblastentheorie

Schon früh beschäftigte die Wissenschaftler das Geheimnis der postfetalen Knochenbildung.

Im Jahre 1739 schrieb Duhamel der Knochenhaut eine osteogenetische Potenz zu, nachdem er die Bildung eines Knochenmantels um subperiostal verpflanzte Silberdrähte beobachtet hatte.

Zu dieser Ansicht wurden unterschiedliche Stellungnahmen bezogen. Das eine Extrem bestand in der Hypothese, daß die Knochenhaut die für den Transplantationserfolg allein entscheidende Bedeutung besäße. Dagegen postulierten andere Forscher, daß die Knochenhaut lediglich ein Stützgewebe des Gefäßsystems darstelle (Haller, 1763), welches nach der Transplantation durch das umgebende Gewebe des Lagers ersetzt werde (Barth, 1893).

Axhausen maß dem benachbarten Gewebe im Transplantatlager eine untergeordnete Bedeutung zu. Die Quelle der Knochenneubildung bildeten für ihn die Osteoblasten im deckenden Periost und Knochenmark des Transplantates (Axhausen, 1907).

In ähnlicher Weise formulierten andere Forscher schon gegen Ende des vorigen Jahrhunderts die spezifische Osteoblastentheorie.

Sie stellten fest, daß Osteoblasten, die von primitivem Bindegewebe, Endost, Periost oder den Haversschen Kanälen abstammen, die Transplantation überleben und neuen Knochen produzieren (Baikow, 1870; Bruns, 1881; Goujon, 1869).

1929 revidierte Schulze die Osteoblastenlehre Axhausens hinsichtlich der Bedeutung der Knochenhaut, da auch nach Transplantation periostfreien autoplastischen Gewebes ein schleichender Knochenersatz festzustellen war.

Für manche Wissenschaftler war die Knochenhaut ohne jegliche Bedeutung für die Knochenbildung. Sie diente lediglich als Grenzmembran. Die Knochenzelle war der Ursprung der Knochenbildung und -regeneration durch ihre Fähigkeit zur Osteoblastenbildung (Davis and Hunnicutt, 1915; Morison, 1923).

1.2 Metaplastische Theorie

1893 postulierte Barth als erster die metaplastische Theorie der Knochenbildung. Er glaubte, daß Knochenneubildung durch solche osteogenetischen Prinzipien aktiviert wird, durch welche undifferenzierte Bindegewebszellen in Knochenzellen umgewandelt werden.

1912 sahen Baschkürzew und Petrow den Ursprung der Knochenregeneration ebenfalls nicht im Transplantat selbst sondern im Weichteillager. Auch sie sprachen sich für die Metaplasie junger Bindegewebszellen zu Osteoblasten und Osteozyten aus.

Das die Metaplasie induzierende Moment wurde in der durch den Transplantationsvorgang bedingten Herabsetzung der Knochenvitalität gesehen. Diese zieht kolloidchemische Veränderungen nach sich, die die pluripotenten Eigenschaften des Bindegewebes zu Tage fördern (Leriche et Policard, 1926; Levander und Willestaedt, 1946).

Nun erhob sich die Frage, ob für die Knochenbildung das Überleben und die Proliferation transplantierter Zellen oder die Induktion von Wirtszellen durch das Transplantat maßgebend sind.

Induktion ist der Vorgang, bei dem Wirtszellen durch Kontakt mit dem transplantierten Gewebe zu Knochenbildung veranlaßt werden (Urist and Mc Lean, 1952).

Urist und Mc Lean glaubten, daß beide genannten Prinzipien in Abhängigkeit von der Art des Transplantates existieren. Bei Verwendung von Gewebekulturen, Periost und Knochenmark schrieben sie die osteogenetische Aktivität v.a. den überlebenden transplantierten Zellen zu, während sie bei Implantation devitalisierten Gewebes die Knochenbildung durch Induktion erklärten.

Außerdem glaubten die beiden Forscher, daß es viele Gewebe gebe, die sowohl durch Proliferation als auch durch Induktion zur Knochenbildung führten. Sie hielten den schleichenden Ersatz, "creeping substitution", für einen notwendigen Prozeß der Knochenbildung durch Induktion.

Mosiman lehnte das Induktionsprinzip nach Transplantation toten Knochens in die vordere Augenkammer ab, da er keinerlei Knochenwachstum beobachten konnte (Mosiman, 1952). Er

beschrieb jedoch ebenfalls den schleichenden Ersatz und zwar als Invasion der alten Haversschen Systeme und Frakturlinien durch Kapillaren, die den alten, sie umgebenden Knochen auflösen. Er beobachtete hierbei keine Riesenzellen.

Mosiman vertrat die Ansicht, daß sowohl das Phänomen des schleichenden Ersatzes als auch das appositionelle Knochenwachstum ihren Ursprung in der Transplantation lebender Knochenzellen haben. Ebenso erklärten Ham und Gordon die Knochenbildung durch das Überleben von Zellen des Transplantates mit osteogenetischer Potenz (Ham and Gordon, 1952).

Andere betonten dagegen den überwiegend zellulären Beitrag des Wirts zum osteogenetischen Vermögen des Transplantates (Heslop et al., 1960; Ray and Sabet, 1963). Sie beobachteten Osteoblasten und die Bildung neuer Knochenmatrix nach Implantation toten Knochengewebes und schlossen daraus, daß die implantierte Matrix die umgebenden Zellen veranlaßt, eine osteogenetische Rolle anzunehmen.

Bei Verwendung devitalisierten Gewebes als Implantat mußten ja alle osteogenetischen Zellen via Transformation von Wirtszellen entstehen. Hiermit war die schon erwähnte Metaplasie - Induktionstheorie erneut bestätigt.

Auch Levander sah sich vor die Alternative gestellt, sich der spezifischen Osteoblastentheorie oder der metaplastischen Theorie anzuschließen. Bei Untersuchungen zur spezifischen Osteoblastentheorie stellte er 1938 fest, daß beim wachsenden Skelett nur das Periost Knochenbildung stimuliert, wohingegen bei voll ausdifferenziertem Knochen sowohl das Periost als auch der Knochen selbst Knochenbildung hervorrufen.

1.3 Hormontheorie

Nach einer Reihe von Experimenten postulierte Levander die Hormontheorie.

Er sah die Knochenbildung als Werk einer spezifischen knochenbildenden Substanz an, welche das unspezifische mesenchymale Gewebe aktiviert. In Analogie zu den Hormonen, die verschiedene Gewebe zur Differenzierung in eine bestimmte Richtung anregen, nahm Levander an, daß die spezifische knochenbildende Substanz ein Hormon sein könnte. Diese Theorie erklärte die verschiedenen Lokalisationen heteroplastischer Knochenbildung.

Annersten unterstützte nach Untersuchungen von homologen und heterologen Knochenextrakten, homologen Nierenextrakten und dialysiertem Urin die Hormontheorie Levanders. Er behauptete, daß eine osteogenetische Substanz im Blut zirkuliere und von den Nieren ausgeschieden werde (Annersten, 1940).

Viele Forscher vertraten ebenfalls die Ansicht, daß eine spezifische osteogenetische Substanz, das "Osteogenin", neben lokalen humoralen Veränderungen, einschließlich Veränderungen der Zirkulation und Wasserstoffionenkonzentration, die Knochenbildung steuere (Annersten, 1939; Bertelsen, 1944; Lacroix, 1947; Leriche et Policard, 1926; Urist and Mc Lean, 1952).

Andere konnten jedoch die Existenz einer solchen Substanz nicht bestätigen (Heinen et al., 1949; Pfeiffer, 1948).

1.4 Kammermodell

1961 beobachtete Goldhaber zum ersten Mal Knocheninduktion durch Milliporefilter hindurch. Er benützte Diffusionskammern, welche beidseits durch ein Zellen ausschließendes Filter verschlossen waren. Somit wurde ein direkter Kontakt zwischen dem frischen Knochenimplantat und dem umgebenden Wirtsgewebe verhindert. Goldhaber schloß daraus, daß der für die Knochenbildung verantwortliche Faktor transmissibel sein mußte.

1965 lehnten Putte und Urist die metaplastische Theorie ebenfalls ab. Sie waren der Ansicht, daß Knocheninduktion nur auf neuer Proliferation, Modulierung und Differenzierung basiert. Die Metaplasie zuvor gebildeter Zelltypen wurde ausgeschlossen.

1.5 Spezifische osteogenetische Substanzen

1967 entdeckten Urist und seine Mitarbeiter eine Gruppe hochkomplexer chemischer Substanzen, die sie für die Knochenbildung für verantwortlich hielten. Sie nannten diesen Komplex BIP, das bedeutet "bone induction principle". BIP dirigiert kompetente hypertrophische Mesenchymzellen in die eine oder andere Differenzierungsrichtung. Es prägt den Mesenchymzellen ein Muster der Morphogenese auf (Urist et al., 1967).

1971 stellten Urist und Strates fest, daß die morphogenetische Aktivität der Knochenbildung ihren Ursprung von einem interfibrillären makromolekularen Proteinkomplex nimmt. Sie nannten den Proteinkomplex BMP, d.h., "bone morphogenetic protein". Das System der Knochenbildung wurde als embryonales Induktionssystem der Osteogenese im postfetalen Leben beschrieben.

1973 definierte Urist das BMP als Induktor, d.h., als eine unlösliche und nichtdiffusible, aber transmissible Substanz.

Die Knochenbildung wird nicht allein durch das BMP sondern auch durch eine lösliche neutrale Proteinase, BMPase genannt, kontrolliert (Urist et al., 1974 (b)). BMPase baut BMP so schnell und selektiv wie ein spezifisches Enzym ab (Urist and Iwata, 1973).

Bis heute wurde noch keine unumstößliche Theorie der postfetalen Knochenbildung aufgestellt.

Die Meinungen der einzelnen Forscher über das Wesen der spezifischen knochenbildenden Substanz gehen noch weit auseinander und bedürfen der Klärung.

2. Literaturübersicht

2.1 Osteoinduktion

2.1.1. BIP

Das "bone induction principle", BIP, wurde von Urist und seinen Mitarbeitern 1967 beschrieben. Es besteht sowohl aus Proteinen der interzellulären Matrix von Dentin, Knorpel und Knochen als auch aus Proteinen des Epithels des Magenfundus, der Gallenblase und des Harntraktes.

Das BIP ist in einem Implantat dekalzifizierter, lyophilisierter Knochenmatrix aktiver als in jedem anderen Gewebe. Auch andere Matrices aus Dentin, Knorpel, Harnblasenepithel etc. können ähnliche osteoinduktive Effekte hervorrufen, allerdings mit geringerer Erfolgsrate und Knochenausbeute.

Urist und seine Mitarbeiter sahen die Zelldifferenzierung bei der Knochenbildung als Antwort auf Kontakt entweder mit der makromolekularen Struktur von Gewebe, welches BIP enthält, oder mit Oberflächen neuinduzierter Zellen.

Das Knocheninduktionssystem besteht wie ein embryonales Induktionssystem aus induzierenden und antwortenden Zellen.

Die induzierende Zelle ist eine Zelle, die mit BIP Kontakt hatte und eine antwortende Zelle zur Differenzierung zu Osteoblasten anregt.

Die antwortende Zelle, eine perivaskuläre hypertrophierte Mesenchymzelle, wird zur induzierten Zelle, wenn sie sich zu einem Osteoblasten, Chondroblasten oder Hämatozytoblasten differenziert.

Eine proliferierende, junge, undifferenzierte Bindegewebszelle besitzt die gesamte nötige genetische Ausrüstung, um sich zu einer Knorpel-, Knochen- oder Knochenmarkszelle zu entwickeln.

Der Prozeß der Induktion erfolgt sowohl in zentrifugaler Richtung, das bedeutet Bildung lamellären Knochens, als auch in zentipetaler Richtung, das bedeutet Bildung von Knochenmarkszellen.

Der Induktionsprozeß setzt sich analog der Organogenese solange fort, bis undifferenzierte Zellen eine große Population neu spezialisierter Zellen, die wie ein Organ angeordnet sind, bilden.

Die Interaktion induktiver Zellen ist ein extrazellulärer Prozeß des mesenchymalen Gewebes, unabhängig von Pinozytose oder Phagozytose von Knochenkollagenfragmenten oder der intrazellulären Aufnahme des BIP (Urist et al., 1967).

Der Proteinkomplex BIP wurde folgendermaßen charakterisiert:

BIP besteht aus säureunlöslichen makromolekularen Proteinen, die mit antigener Aktivität verbunden aber von dieser trennbar sind.

Das BIP kann durch Diffusion kurze Strecken überwinden, dies jedoch nicht frei in Lösung in extrazellulären Räumen.

Der Komplex wird durch hohe oder tiefe Temperaturen, Strahlung und Zytoplasmagifte, die Proteine denaturieren, zerstört.

2.1.2. BMP und BMPase

2.1.2.1. Funktionelle Charakterisierung des BMP

Eine chemische Verbindung aus Kollagen und einem nichtkollagenen Protein (BMP) oder einem Teil eines Proteins, welches durch eine neutrale Proteinase gespalten wird, kontrolliert die knochenbildende Reaktion (Urist et al., 1973).

Das BMP ist für die Modulation und Differenzierung von Mesenchymzellen des Muskels zu Knochen und Knochenmarkszellen verantwortlich (Urist and Strates, 1971). Die Osteogenese ist also offenkundiger Ausdruck einer protein (BMP)- induzierten, RNA- gesteuerten DNA- Synthese (Urist, 1973).

Über die genaue Wirkungsweise des BMP gibt es nur Spekulationen.

Urist behauptete 1970, daß das BMP als ein unlösliches, nichtdiffusibles induktives Substrat wirke. 1973 stellte er zwei mögliche Wirkungsmechanismen des BMP einander gegenüber. Der eine Mechanismus besteht in der Endozytose des intakten Moleküls, welches eine RNA-gesteuerte DNA-Synthese in Osteoblasten hervorruft. Diese These vertraten auch andere Forscher, die behaupteten, daß das BMP als in Zellen aufgenommener, Fibroblasten transformierender Faktor wie ein Virus wirke (Huggins et al., 1970; Wlodarski et al., 1971).

Andererseits kann das BMP evtl. ohne Endozytose großer morphogenetischer Moleküle, Plasmamembranen ein morphogenetisches Muster aufprägen (Urist, 1973).

Das BMP ist nicht speziesspezifisch. Von Kaninchen gewonnenes BMP induziert Knochenbildung in Ratten (Urist et al., 1979).

2.1.2.2. Biochemische Charakterisierung des BMP

Das BMP ist fest an Knochenkollagen gebunden, welches selbst eine außerordentlich schwerlösliche und stark quervernetzte Form von Kollagen darstellt (Urist, 1973; Urist and Strates, 1971).

1972 sahen Urist und seine Mitarbeiter die knochenmorphogenetische Komponente entweder als nichtkollagenes, kovalent an Knochenkollagen gebundenes Protein oder als Telopeptid, welches vom C- oder N-terminalen Ende der nichthelikalen Anteile des Knochenkollagenmoleküls abstammt, oder als Komplex aus beiden Substanzen an.

BMP-Kollagen-Komplexe können eine Milliporemembran von 125 µm Dicke und einer Porengröße von 0,45 µm durchdringen. Eine kleinere Porengröße läßt den Durchtritt morphogenetisch aktiven Materials nicht zu (Urist, 1973).

Chemische Extraktionen bei niedrigem pH und in Kälte entfernen einen signifikanten Teil der Polysaccharide, Lipide und Nukleinsäuren der Knochenmatrix, ohne daß die morphogenetische Aktivität verloren geht (Iwata and Urist, 1972; Urist et al., 1972).

Das BMP stammt von einer Aufbereitung von Knochengelatine ab, die in Wasser bei 2° C unlöslich, in Körperflüssigkeiten bei 37° C jedoch löslich ist (Urist et al., 1977 (b)). Zwischen 70° C und 100° C werden die morphogenetischen Eigenschaften des BMP zerstört (Urist, 1973).

Der Proteinkomplex ist bei 2° C in EDTA unlöslich, bei 25° C und 37° C geht die Aktivität bis auf Null zurück (Urist, 1973).

Das BMP stellt einen wesentlichen Teil der kollagenaselöslichen Fraktion nichtkollagener Proteine dar (Leaver et al., 1975 (b)). Es ist alkaliempfindlich und trypsinlabil (Urist et al., 1973; Urist et al., 1974 (b)).

Durch Reduktion und Oxydation mit Mercaptoaethanol wird die BMP-Aktivität reversibel ausgelöscht. Das BMP ist reich an Glycin, Tyrosin, Asparaginsäure, Phenylalanin, Serin und Cystein. Es enthält kein Hydroxyprolin, Hydroxylysin oder Phosphor und nur Spuren von Pentosen (Urist et al., 1975 (a)). BMP ist ein Glykoprotein (Urist et al., 1979).

2.1.2.3. Chrakterisierung der BMPase

Neutrale Pufferlösungen aktivieren endogene Enzyme, die für die Zellinteraktionen und die Differenzierung zu Knochen wesentliche Bestandteile abbauen (Urist et al., 1973).

Dieser BMP-Abbau zeigt außer der pH- eine Temperaturabhängigkeit. Die für den Abbau verantwortliche endogene BMPase ist nämlich bei 2 ^{o} C und pH 7,0-7,4 hochaktiv (Urist, 1973). Bei Temperaturen zwischen 40 ^{o} C und 60 ^{o} C wird sie inaktiviert. Das Enzym ist eng verbunden mit, aber abspaltbar von BMP (Urist and Iwata, 1973).

Das BMP-BMPase System tritt nur im Knochengewebe auf, ob intra- oder extrafibrillär ist nicht bekannt.

Die BMPase kann reversibel gehemmt werden durch p-Chlorquecksilberbenzoesäure und Cystein bei pH 7,4 (Urist, 1973). Der BMP-Abbau wird ebenfalls verhindert durch Jodessigsäure (3 molar) in Phosphatpuffer oder EDTA.

Ansonsten wird das BMP frisch entnommenen Knochens bei 25 ^{o} C bis 37 ^{o} C innerhalb von 24 Stunden abgebaut (Urist and Iwata, 1973).

Die Aktivität der BMPase ist vergleichbar mit der des Trypsins. Die BMPase löst jedoch kein Kollagen und ist spezifischer für den BMP-Abbau als Trypsin (Urist et al., 1973).

Durch Dehydrieren und Lyophilisieren wird das endogene Enzym konserviert (Urist et al., 1974 (b)). Die lyophilisierte Matrix muß daher unter Ausschluß von Luft und Feuchtigkeit gelagert werden, da sonst das BMP der rehydrierten Matrix von der BMPase abgebaut werden kann (Urist, 1973).

2.1.3. Kammermodell

Goldhaber benutzte 1961 zum ersten Mal das Kammermodell, bei dem das zu implantierende Gewebe in beidseitig mit Milliporefiltern verschlossene Diffusionskammern eingebracht wurde. Als Ergebnis konnte eine Knocheninduktion durch die Filter hindurch beobachtet werden.

Nachdem Goldhaber unter Verwendung des Kammermodells bei Implantation von Schädelknochen so erfolgreich gewesen war, wendeten andere Forscher ebenfalls das Kammerprinzip an. Sowohl nach Implantation von Osteosarkomen von Mäusen (Heiple et al., 1968; Amitani and Nakata, 1975) als auch nach Implantation demineralisierter Knochenmatrix (Buring and Urist, 1967; Upton, 1972) wurde außerhalb der Diffusionskammer neuer Knochen gebildet. 1975 erhielten Nogami und Urist ebenfalls positive Ergebnisse nach Implantation gemahlener Knochengelatine in Kammern.

Die Diffusionskammern bestanden aus einem oder mehreren Plastikringen und Zellulose-Azetat-Membranen bekannter Porengröße, die auf die Ringe zementiert wurden.

Upton verwendete 1972 eine Kammer, welche nur aus Milliporefilter bestand. Er klebte das Filterpapier zu einem das Implantat umhüllenden Umschlag zusammen und verzichtete auf Plastikringe.

Auch hier wurde Knochenbildung an der Außenseite des Filters verzeichnet.

Nach Implantation der Diffusionskammer kann interstitielle Flüssigkeit in diese hinein und aus ihr herausdiffundieren, Zellen sind jedoch von diesem Vorgang ausgeschlossen.

Die Durchdringung der Membranen durch Zellfortsätze (Mikrovilli) und das Austreten diffusibler Substanzen werden durch die Porengröße und die Dicke der Membranen kontrolliert.

In vivo muß, um Knochenbildung zu erzielen, die Membran eine Porengröße von 0,22-0,6 µm besitzen. Hier finden Mikrovilli und kollagene Fibrillen genügend Platz.

Bei einer Porengröße von 0,025-0,1 µm ist nur noch ein Efflux löslichen BMGs möglich, jedoch keine Knochenbildung mehr.

Hieraus schlossen Nogami und Urist, daß Mikrovilli bei der Knochenbildung eine wichtige Rolle spielen. Sie vermuteten in den Mikrovilli Plasmamembranrezeptoren für BMP (Urist and Nogami, 1975).

1977 fanden Urist und seine Mitarbeiter nach Implantation von Knochengelatine in Diffusionskammern heraus, daß sich die Knochenausbeute umgekehrt proportional zur Kammerwanddicke, d.h. zur Länge der vom BMP zu durchwandernden Diffusionsstrecke, verhält.

2.2 Chronologischer Ablauf der Osteogenese

Nach freier Implantation von Knochenmatrix in eine außerhalb des Skelettes gelegene Stelle entsteht ein neues Knöchelchen samt funktionellem Knochenmark. Der Vorgang läuft in Form der enchondralen Osteogenese ab (Reddi and Anderson, 1976).

Am ersten postoperativen Tag stellt die implantierte Matrix ein diskretes Konglomerat aus Fibringerinnsel und polymorphkernigen Leukozyten dar.

Am dritten Tag verschwinden die Leukozyten, Fibroblasten lagern sich dicht an die kollagene Matrix an. Diese anfängliche Matrix-Membran-Interaktion gipfelt in der Differenzierung der Fibroblasten zu Chondroblasten und Osteoblasten (Reddi and Anderson, 1976).

Um den fünften Tag dringen Mesenchymzellen in alte Gefäßkanäle des Implantates ein.

Mesenchymzellen vereinigen sich, um Matrixklasten zu bilden oder zu Knorpel auszudifferenzieren. Dies geschieht um den zehnten postoperativen Tag herum (Urist, 1970).

Nach ca. zwei Wochen treten zum ersten Mal Ablagerungen neuen Knochens auf. Diese nehmen über eine Zeitspanne von drei Wochen ständig zu (Urist et al., 1970).

20-30 Tage nach der Matriximplantation wird der neugebildete Geflechtknochen zu lamellärem Knochen umgebaut. Mesenchymzellen bilden einen zentralen Pool aus Knochenmark (Urist, 1970).

Der beschriebene Verlauf der Knocheninduktion ist dem der Frakturheilung langer Röhrenknochen ähnlich (Ham and Harris, 1971), woraus sich möglicherweise eine Bedeutung der Knochenmatrix bei Reparationsprozessen ergibt (Reddi and Anderson, 1976).

Die Osteogenese hängt von der Aktivität neuer Zellpopulatione ab, die sowohl kollagenolytische als auch kollagenosynthetische Enzyme bilden (Urist et al., 1970).

Die verschiedenen Knochenzelltypen sind verschiedene funktionelle Stadien derselben Zelle.

Die Zellteilung ist normalerweise beschränkt auf das morphologisch nichtspezialisierte Stadium der Osteoprogenitorzelle, der Vorläuferzelle der Knochenzellen. Die spezialisierten Knochenzellen stammen also von der Osteoprogenitorzelle ab.

Die durchschnittliche Zellbildungszeit ist am kürzesten in der Metaphyse und am längsten im Periost. Die Durchschnittsdauer der DNA-Synthese liegt relativ konstant bei acht Stunden.

Nach der Teilung können die Zellen im Stadium der Osteoprogenitorzelle im Progenitor-Pool bleiben. Sie können sich aber auch einer Veränderung des Zelltypes unterziehen, indem sie sich zu Osteoblasten spezialisieren (Young, 1962).

Die Differenzierung der Osteoprogenitorzelle wird durch lokale Veränderungen des Zellmetabolismus, die noch nicht genau charakterisiert sind, hervorgerufen (Urist, 1965).

2.3 Verschiedene osteogenetisch aktive Gewebe

2.3.1. Epitheliale Zellen

2.3.1.1. Uroepitheliale Zellen

Schon im Jahre 1917 fand Neuhof heraus, daß auf der Oberfläche von Fascientransplantaten, die zur Deckung von Harnblasendefekten bei Hunden benutzt wurden, normal gebildeter Knochen entstand.

Huggins wiederholte diese Versuche erfolgreich und zeigte Knochenneubildung um Autotransplantate von Blasen- und Ureterepithel sowie Epithel der Nierenbecken an verschiedenen Stellen weichen Gewebes bei Hunden (Huggins, 1931; Huggins et al., 1936).

Übergangsepithel verfügt also über osteogenetische Eigenschaften, nicht jedoch das Epithel von Nierenmark und Nierenrinde.

Normalerweise bildet uroepitheliales Gewebe wahrscheinlich deshalb keinen Knochen, weil es von einem Bindegewebe umgeben ist, das sich von dem der mehr parietalen Regionen unterscheidet (Huggins and Sammet, 1933).

1962 transplantierte Friedenstein Zellen des Übergangsepithels in Diffusionskammern und kam zu dem Ergebnis, daß das Übergangsepithel offenbar eine Substanz besitzt, die aus der Epithelzelle herausdiffundieren und ohne Zellkontakt Knochenbildung stimulieren kann.

2.3.1.2. Gallenblasenepithel

Versuche an Hunden und Guinea-Schweinen ergaben, daß proliferierendes Gallenblasenepithel dazu in der Lage ist, in bestimmten Bindegeweben, wie dem der Bauchwand, Knochenbildung hervorzurufen.

Dieser Vorgang ist streng an das betreffende Bindegewebsmaterial gebunden.

Das subepitheliale Bindegewebe der Gallen- und Harnblase nimmt nicht teil an dieser Gewebsreaktion. Sie widerstehen dem Stimulus des Epithels. Es besteht somit ein physiologischer Unterschied zwischen morphologisch identischen Bindegeweben und zwar der, den osteogenetischen Stimulus eines geeigneten Epithels zu beantworten (Huggins and Sammet, 1933).

2.3.1.3. Amnionzellen

Hancox und Wlodarski injizierten 1972 kortisonvorbehandelten Ratten menschliche Amnionzellen in Bein-, Bauchwandmuskulatur oder subcutan. In den beiden Muskelgeweben wurde die Bildung von Knorpel- und/oder Knochengewebe leicht ausgelöst. An den subcutan behandelten Stellen war dies nicht der Fall.

Die beiden Forscher glaubten, daß sich der Induktor, welcher von epithelialen Zellen ausgeht, von dem von Urist und seinen Mitarbeitern 1967 beschriebenen Knocheninduktionsprinzip unterscheidet.

Epitheliale Zellen müssen leben, um Knochenbildung zu bewirken, da mit HCl behandelte und lyophilisierte epitheliale Zellen keinen neuen Knochen bilden.

Trotzdem scheint die Knocheninduktion von der Proliferation transplantierter Zellen unabhängig zu sein. Dies wurde belegt durch Bestrahlung epithelialer Zellen in vitro, die sich nach der Bestrahlung unverändert teilten, aber eine Abschwächung der Knochenbildung aufwiesen.

2.3.2. Knochen- und Dentingewebe

1938 stellte Levander fest, daß intramuskuläre Injektionen von Alkoholextrakten von Knochengewebe und Kallus ektopische Knochenbildung bewirkten. Bei Verwendung von Alkohol alleine und von Alkoholextrakten des Bindegewebes ergaben sich negative Ergebnisse.

Nach Injektion von Alkoholextrakten von Epyphysen neugeborener Kaninchen in die Oberschenkelmuskulatur von Artgenossen beobachtete Lacroix 1945 nach 41 Tagen Knorpel, Knochen und hämatopoetisches Mark. Die für die Stimulierung der Osteogenese verantwortliche Substanz nannte Lacroix "Osteogenin" (Lacroix, 1947).

1944 verglich Bertelsen alkoholische Extrakte kompletten Knochens mit solchen von Knochenmark, Kortikalis, Epiphyse und Periost. Die Knochenmarkextrakte waren den übrigen deutlich in der Knochenbildung überlegen.

1952 fanden Ray und seine Mitarbeiter heraus, daß Transplantate embryonalen Knochens und autogene Transplantate von Frakturkallus sowie ausgereifter Kortikalis an geeigneten ektopischen Stellen überleben und proliferieren.

Durch Iso- und Homoimplantation lyophilisierter Mäuse-Osteosarkome wurde innerhalb von 21 Tagen Knochenneubildung induziert. Amitani und seine Mitarbeiter nahmen an, daß nur Tumoren,welche aus Knochengewebe bestehen, osteoinduktive Eigenschaften besitzen (Amitani et al., 1974).

Frisches Osteosarkomgewebe war osteogenetisch bedeutend aktiver als normales Knochengewebe. Diese Untersuchungen wurden unter Benutzung von Goldhabers Diffusionskammertechnik durchgeführt (Heiple et al., 1968). Das Tumorgewebe produzierte anscheinend eine größere Menge des Knochenbildung induzierenden Agens (Amitani, 1973).

Schon im späten 19. Jahrhundert diente dekalzifizierte Matrix als autogenes Transplantat zur Auffüllung von Defekten, die bei der chirurgischen Behandlung der Osteomyelitis entstanden (Deaver, 1889; Mackie, 1890; Miller, 1890).

Später trat die Bedeutung des Entkalkungsmediums hervor.

Sharrard und Collins konnten 1961 einen Erfolg verbuchen nach Verwendung von in EDTA dekalzifiziertem homogenem Knochen für die Wirbelgelenke an Skoliose erkrankter Kinder.

HCl erwies sich als geeignetes Entkalkungsmedium, während EDTA sich als weniger günstig herausstellte, da es Mukoproteine des Knochens extrahiert. Salpetersäure gar macht die Knochenmatrix anfällig gegenüber proteolytischen Enzymen und verursacht im Empfängerlager massive Entzündungsreaktionen. Eine Knochenbildung bleibt aus.

Nichtdekalzifizierte oder rekalzifizierte Matrix wird langsamer resorbiert und produziert weniger neuen Knochen als dekalzifizierte Matrix (Putte and Urist, 1965).

Die demineralisierte kortikale Knochenmatrix ist ein Substrat der Knochenbildung durch postfetale Mesenchymzellen (Urist, 1970).

1972 behauptete Upton sogar, daß dekalzifizierter, lyophilisierter Knochen von allen Knochenaufbereitungen über die größte osteogenetische Potenz verfüge.

Reddi stellte unter den von ihm getesteten Matrixarten eine strenge Spezifität fest. Nur Knochen- und Zahnmatrix hielt er für osteogenetisch aktiv. Sehnengewebe, Haut und Knorpel ergaben inaktive Matrices (Reddi, 1976).

Die Knochenmatrix setzt sich aus fünf Hauptbestandteilen zusammen: Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten, Salzen und Wasser (Urist, 1973).

Eine nichtkollagene Matrix kann durch Kollagenase-(Oldroyd and Herring, 1967) oder EDTA-Behandlung (Leaver et al., 1975 (a)) isoliert werden.

Eine nichtkollagene Knochenmatrix unterscheidet sich von einer nichtkollagenen Dentinmatrix hinsichtlich des Phosphatgehaltes der anionischen Komponenten, welcher bei der Dentinmatrix höher ist, und hinsichtlich unterschiedlicher Proteinanteile der Proteoglykane.

Anionische Glykoproteine, Phosphoproteine und wenig-saure Glykoproteine sind möglicherweise von Bedeutung bei Mineralisationsprozessen von Dentin und Knochen.

Es bestehen zwar Unterschiede in der Zusammensetzung der Matrixglykoproteine verschiedener Spezies, diese sind aber relativ gering.

Anscheinend gibt es innerhalb der verschiedenen Spezies sich entsprechende und miteinander verwandte individuelle Glykoproteine (Leaver et al., 1975 (a)).

Auch unlösliche Knochengelatine, ein Extrakt der Knochenmatrix mit Einschlüssen unlöslichen nichtkollagenen Proteins, bildet neuen Knochen. Der implantierte Überrest bereitet das Milieu für die knochenbildende Fähigkeit der wandernden Mesenchymzellen.

Die Knochenbildung wird durch eine Andauung der BMG mit Pepsin oder Kollagenase nicht verhindert (Urist et al., 1973).

1975 unternahmen Nogami und Urist Untersuchungen mit Knochengelatine und stellten diese Kollagenase angedauter BMG gegenüber. Die Substanzen wurden jeweils in Kammern implantiert. Die mit Kollagenase angedaute BMG erwies sich qualitativ der unbehandelten BMG gegenüber gleichwertig, quantitativ konnte jedoch ein größerer Knochenertrag erzielt werden. Gegenüber Implantaten aus lebenden Knochenzellen erweist sich die nicht angedaute BMG jedoch als osteogenetisch aktiver. Die osteogenetische Aktivität der Implantate nimmt also in folgender Reihenfolge zu: lebende Knochenzellen - BMG - mit Kollagenase angedaute BMG.

2.3.3. Sonstige Gewebe

1739 beschrieb Duhamel die osteogenetische Potenz der Knochenhaut. Wie erwähnt, beobachtete er um subperiostal verpflanzte Silberdrähte die Bildung eines Knochenmantels.

1952 implantierten Urist und Mc Lean verschiedene Gewebe in die vordere Augenkammer ihrer Versuchstiere. Dabei erwiesen sich Periost, Knochenmark, fibrokartilaginöser Kallus, Epiphysen- und Gelenkknorpel als osteogenetisch aktiv.

Das Periost bildete nur kompakten Knochen, keinen Knorpel oder Knochenmark. Das Knochenmark, der Kallus, der Epiphysen- und Gelenkknorpel führten zur Entstehung kompletter Knöchelchen mit Kortikalis und hämopoetischem Mark.

2.4 Unspezifische Stimuli und Einflußfaktoren

2.4.1. Chemische Einflüsse

1946 konnten Martin und Zarapico nach Injektion von 40%igem Alkohol in den M.rectus femoris von Kaninchen in 8% der Fälle Knorpel- und/oder Knochenbildung beobachten.

Auch andere Forscher berichteten über eine Osteogenese durch Alkohol oder Calciumchlorid als Stimulus (Heinen et al., 1949; Hartley and Tanz, 1951).

Diese Ergebnisse stehen in krassem Widerspruch zu Levanders Behauptung, daß Alkohol alleine keine Knochen- oder Knorpelbildung bewirke (Levander, 1938).

Die Konservierung von Knochenmatrix in 70%igem Alkohol hat keine nachteiligen Auswirkungen auf die Knochenbildung, wohingegen anaesthetischer Äther als Konservierungsmittel angewandt eine Osteoinduktion verhindert (Tuli and Chaudhuri, 1979).

Bei der Füllung von Skelettdefekten bei Hunden, Katzen und Affen konnten die implantierten Hydroxyapatitkristalle von neuem Knochen ersetzt werden. Die Kristalle erwiesen sich bei der Reparation des Defektes allerdings als weniger wirkungsvoll als autogene Knochentransplantate. Das Problem, ob die Kristalle Knochenneubildung stimulierten oder induzierten, blieb ungelöst (Ray and Ward, 1952).

Nach Injektion von basischem Calciumphosphat in die vordere Augenkammer von Guinea-Schweinen konnte nach sechs Wochen lediglich eine Fremdkörperreaktion beobachtet werden. Eine hohe lokale Calciumkonzentration war alleine nicht imstande, die Metamorphose von Bindegewebszellen in Chondrozyten und Osteozyten herbeizuführen (Ray et al., 1952).

1975 untersuchten Bélanger, Robichon und Urist den Einfluß des Magnesiumhaushaltes auf die Knochenbildung. Dabei ergab sich, daß sich nach Implantation demineralisierter Tibiadiaphysen in die Lumbalmuskulatur von Ratten bei den Tieren mit normalem Magnesiumhaushalt trabekulärer Knochen bildete. Bei den Ratten mit einem Magnesiumdefizit wurde das Implantat von einem fibrokartilaginösen Mantel eingescheidet. Das Wachstumsmuster wurde durch den Magnesiummangel modifiziert.

2.4.2. Physikalische Einflüsse

Untersuchungen an Versuchstieren und klinische Studien belegen, daß elektrische Kräfte Knochenwachstum stimulieren (Spadaro, 1977).

Zumindest stellt eine geeignete elektrische Umgebung einen kontrollierenden Faktor bei der Knochenregeneration dar (Becker, 1961).

Nach einem Frakturtrauma veranlaßt das neurale Kontrollsystem die Herstellung der für die Regeneration geeigneten elektrischen Umgebung. Das elektrische Signal persistiert eine bestimmte Zeit und wird dann langsam bis zum Ende der Frakturheilung abgebaut (Becker, 1978).

Brighton und seine Mitarbeiter beschrieben den Effekt des elektrischen Stromes auf die physiologische Umgebung der Zelle als Änderungen der Sauerstoffspannung und des pH-Wertes in der Nachbarschaft einer Kathode. In vitro ergaben sich bei kleiner Stromstärke von 10-20 µamps Knochenbildung in der Nähe der Kathode, wobei Sauerstoff in beinahe stöchiometrischen Raten verbraucht wurde. Eine Stromstärke von 100 µamps erwies sich für den Knochen als toxisch. In diesem Fall wurde an der Kathode Wasserstoff direkt proportional zur Stromstärke freigesetzt.

Falls diese Beobachtungen in vivo ebenso zutreffen, sind die Senkung der lokalen Gewebssauerstoffspannung und das Anheben des lokalen pH-Wertes Mechanismen, die bei der elektrisch induzierten Knochenbildung mitwirken (Brighton et al., 1975).

Bassett sprach sich 1964 dafür aus, daß eine hohe Sauerstoffsättigung die Entstehung von Osteoprogenitorzellen begünstige. Eine niedere Sauerstoffspannung führe eher zu Differenzierung von Chondroprogenitorzellen und Knorpel als von Knochen.

Heinen und seine Mitarbeiter stellten fest, daß das Ausmaß intramuskulärer Knorpel- und Knochenbildung nach Injektion von Alkohol oder Calciumchlorid durch ein Bewegungstraining der Versuchstiere gesteigert wurde (Heinen et al., 1949).

Glucksman untersuchte den Einfluß mechanischer Kräfte auf die Knochenbildung in vitro. Durch die Versuchsanordnung in vitro konnten die indirekten Einflüsse durch Änderung der Blutversorgung und damit der Ernährung des Skelettes ausgeschlossen werden. Auf Knorpel ausgeübte Druck- und Zugkräfte führten in vitro zu einer Reorientierung der Knorpelzellen. Die hyaline Grundsubstanz zerfiel und wurde durch ein fibrilläres System ersetzt.

Die Spannungskräfte förderten die Knochenbildung osteogenetischen Gewebes und bestimmten das Muster der Knochenarchitektur, d.h., in vitro kultiviertes Gewebe des Skelettes

antwortet direkt auf mechanische Beanspruchung (Glucksman, 1942). Bestrahlte Knochentransplantate induzieren keine Knochenbildung (Heiple et al., 1968).

Sterilisation mit Gammastrahlen zerstört die morphogenetische Eigenschaft des Implantates, und zwar ist hierfür bei nichtdemineralisiertem Knochen eine viel geringere Dosis nötig als bei demineralisiertem.

Der der organischen Matrix zugefügte Schaden wird durch die Erregungsübertragung von den bestrahlten Knochenmineralien auf die Matrixproteine erhöht. Außerdem besitzen die Mineralien ein relativ hohes Ionisationspotential und bilden hoch reaktive freie Radikale.

Die radioaktive Strahlung verhindert aber weder die unerwünschte Überempfindlichkeitsreaktion noch den Abbau des BMP durch endogene Proteasen (Urist and Hernandez, 1974).

Durch das Kochen des Knochens wird die Knochenbildung nicht prinzipiell verhindert. Exzessives Kochen zerstört jedoch wahrscheinlich einen Großteil der osteogenetischen Induktionssubstanz (Urist and Mc Lean, 1952).

Das Wesen der Kältekonservierung von Transplantaten ist die extreme Reduzierung der intra- und extrazellulären Stoffwechselvorgänge bis zur vita minima. Der Zelltod durch Tiefkühlung ist abhängig vom Differenzierungsgrad der Zelle. Je geringer der Differenzierungsgrad, um so größer ist die natürliche Kälteresistenz. Bei kältekonserviertem Knochengewebe ist die Fähigkeit zur vitalen Leistung gering, zeitlich beschränkt und von besonders schonenden Konservierungsbedingungen abhängig (Friedebold et al., 1963).

2.4.3. Sonstige Einflüsse

2.4.3.1. Immunologische Faktoren

Bei autologen Transplantaten ist die Nekrosebildung ausschließlich eine Frage der Ischämie.

Bei heterologen Transplantaten kommt das Moment der Immunreaktion hinzu.

Drei Faktoren sind für die Einheilung des Transplantates maßgebend: Die Aktivität des Transplantates, die des Wirtslagers und die der Immunreaktion.

Im Wirt gebildete Antikörper wirken auf das heterologe Transplantat ein und bewirken eine Nekrose als gesetzesmäßigen Vorgang (Willenegger und Hulliger, 1964).

Heiple und seine Mitarbeiter konnten 1968 bei der Testung von Osteosarkomen von Mäusen in Mäusen eine Knochenbildung feststellen, die jedoch bei der Testung von Osteosarkomen von Menschen in Mäusen ausblieb. Sie hielten mehrere Ursachen für möglich. Entweder verhinderten humorale Antikörpereffekte die Induktorproduktion des Tumors, oder der Induktor ist speziesspezifisch, oder aber die Ergebnisse für Mäuse-Osteosarkome treffen für menschliche Osteosarkome nicht zu.

Auch Putte und Urist machten 1965 die Erfahrung, daß xenogene Matrix weniger Knochen bildet als allogene und eine Entzündungsreaktion verursacht.

Dasselbe berichteten Tuli und Chaudhuri 1979 über ihre Versuche mit xenogener und allogener Knochenmatrix.

Die Immunreaktion im Transplantatlager ist Ausdruck der Art- und Individualspezifität des Proteins. Eine Minderung dieser immunbiologischen Reaktion ist nach Friedebold beispielsweise durch Kältekonservierung möglich, bei der die Proteinkonformation verändert wird (Friedebold, 1963).

Andere schrieben der Dekalzifizierung und Einfrierung von Knochentransplantaten für die Immunogenität kaum Bedeutung zu. Sie bevorzugten die Gefriertrocknung als Mittel zur Reduktion der Antigenität (Elves and Salama, 1974).

Ein weiteres Verfahren zur Minderung der Zahl der vom Empfänger absorbierbaren Haptene stellt die begrenzte chemische Extraktion von hydrophoben Glykopeptiden und eine subtotale Autodigestion der Spenderzellen und Plasmamembranen nichtdemineralisierten kortikalen Knochens in vitro dar (Urist et al., 1975 (b)).

2.4.3.2. Implantationsstelle

Die Knochenbildung nach Implantation osteogenetisch wirksamer Substanzen zeigt eine Abhängigkeit von der Implantationsstelle.

Menschliche Amnionzellen rufen in der Bein- oder Bauchmuskulatur von Ratten Knochenbildung hervor, subcutan jedoch nicht (Hancox and Wlodarski, 1972).

Als geeignete Stellen für Knochentransplantate erweisen sich die Skelettmuskulatur, die Hirnventrikel und die vordere Augenkammer. Die vordere Augenkammer bietet den Vorteil, daß das Schicksal des Transplantates mit einer Spaltlampe verfolgt werden kann (Ray et al., 1952). Außerdem wird jeder direkte Kontakt mit dem Skelett des Wirtes ausgeschlossen (Urist and Mc Lean, 1952).

2.4.3.3. Art und Alter der Versuchstiere

Als geeignete Versuchstiere kommen v.a. Ratten, Guinea-Schweine und Kaninchen in Betracht (Ray et al., 1952).

Das Alter des Transplantat-Empfängers und evtl. auch das des -Spenders spielen ebenfalls eine Rolle. Schon 1949 erkannten Heinen und seine Mitarbeiter, daß junge Kaninchen als Empfänger mehr und reiferen Knorpel und Knochen bildeten als ältere Tiere.

Fasol und Galle gingen mit dieser Ansicht konform durch ihre Forderung eines ersatzstarken Lagers für die Knocheneinheilung bei Knochentransplantation. Ein ersatzstarkes Lager bietet nämlich nur ein junger Empfänger mit gesundem umgebendem Knochengewebe (Fasol und Galle, 1973).

Urist stellte 1973 ebenfalls fest, daß mit zunehmendem Alter des Empfängers die Knochenbildung geringer ausfiel. Dem Alter des Spenders maß er keine Beudeutung zu.

Andere Forscher erzielten jedoch eine deutlich höhere Knochenausbeute bei Verwendung von Implantationsmaterial neugeborener oder noch besser in der Adoleszenz befindlicher Spender (Lacroix, 1945; Lacroix, 1947; Heiple et al., 1968).

2.4.3.4. Menge des Implantates und Größe der Implantatpartikel

Der Gewinn an neuem Knochen wird außerdem von der Menge des Implantates beeinflußt. Er verhält sich proportional zur Menge der implantierten Matrix und ist von der Resorption des alten Knochenkollagens abhängig. Die Relation zwischen Knochenneubildung und eingesetzter Matrixmenge scheint dem Michaelis-Menten-Gesetz zu gehorchen.

Wolter und seine Mitarbeiter waren der Ansicht, daß für den Knochenumbau ihrer Transplantate der Ausbildung einer Gefäßstraße und der Menge der übertragenen Substanz eine entscheidende Bedeutung zukomme (Wolter et al., 1975).

Die Aussage Urists und seiner Mitarbeiter 1970, die Größe der Implantatoberfläche spiele keine Rolle, wurde alsbald revidiert. Die Pulverisierung der Knochenmatrix bleibt nur bis zu einer gewissen Partikelgröße bedeutungslos. Diese wird zwischen 200 µm und 400 µm angesetzt. Kleinere Partikel rufen eine Entzündungsreaktion ohne Knorpel- oder Knochenbildung (Urist et al., 1975 (b)) oder nur eine sehr geringe Knochenbildung hervor (Urist and Dowell,1968).

2.5 Alkalische Phosphatase als Maß der Knochenbildung

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) ist ein Maß für die Induktion intrazellulärer Enzyme. An intramuskulär implantierter Knochenmatrix wurden sowohl elektronenmikroskopische Untersuchungen als auch Enzymaktivitätsmessungen vorgenommen. Dabei zeigte sich, daß die Aktivität der AP den frühesten Hinweis für die Differenzierung von Osteoblasten liefert. Eine Zelldifferenzierung wurde in intramuskulären Knochenmatriximplantaten unter Zuhilfenahme von quantitativ-chemischen und elektronenmikroskopisch-morphologischen Methoden innerhalb von sechs Tagen, zwei Tage vor dem Erscheinen von Knochengewebe, beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt produzieren Zellen mit der Morphologie hypertrophierter Mesenchymzellen 25-Mal mehr AP als gewöhnliche Fibroblasten. Über einen Zeitraum von 8-30 Tagen, während der Knochen sich entwickelte, nahm die AP-Aktivität um das 70-Fache, verglichen mit der Aktivität der Fibroblasten, zu. Nach 30 Tagen fiel die Enzymaktivität auf das 20-Fache der Fibroblastenenzymaktivität ab (Firschein and Urist, 1972).

Die AP-Aktivität zeigt an, daß ein Muster der Knochenbildung von der alten Matrix an neue Zellpopulationen weitergegeben wurde (Urist, 1970).

3. Problemstellung

Durch die rasante Weiterentwicklung in der Knochen- und Wiederherstellungschirurgie werden die Ansprüche, die an ein Knochentransplantat gestellt werden, derart gesteigert, daß sie fast nurmehr von autologem Material erfüllt werden können (Fasol und Galle, 1973).

Bei der Deckung großer Knochendefekte wirft dies Probleme auf, da autologes Material nur begrenzt zur Verfügung steht.

Es ist folglich wünschenswert, allogenes oder gar xenogenes Knochenmaterial einsetzen zu können. Die Spätergebnisse nach Implantation xenogenen Materials sind jedoch enttäuschend (Fasol und Galle, 1973).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Aufbereitung allogenen Knochenmaterials.

Die Frage lautet, durch welche Behandlungsmaßnahmen die größte osteoinduktive Wirkung erzielt werden kann.

Ferner gehen der Einfluß des von Goldhaber erstmals beschriebenen Kammermodells (Goldhaber, 1961) und der Partikelgröße des implantierten Materials in die Untersuchungen ein.

4. Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1. Tiere:

männliche SPF-Sprague-Dawley-Ratten
Gewicht: 280-350 g
von der Gesellschaft für medizinische Versuchstierzuchten mbH, Dr. Ivanovas, Kissleg im Allgäu, BRD
Ernährung: Altromin-R Standarddiät (Altromin GmbH, Lage, BRD) und Wasser.

4.1.2. Geräte:

Fraktionensammler (LKB-Ultrorac Fraction Collector, Bromma, Schweden)

Gassterilisator (KGS 2590, Sterilisation mit Äthylenoxid, Münchener Medizin Mechanik)

Gefriermühle (Spex Industries, New Jersey, USA)

Lyophilisator (Beta 1, Christ, Osterode/Harz)

Magnetrührer (Bachofer, Reutlingen)

Messerhomogenisator (max. 10000 UpM, Bühler, Tübingen)

Monitor (LKB-Uvicord III 2098, Bromma, Schweden)

peristaltische Pumpe (3600 Colora, Lorch)

pH-Meter(Digitalimeter DIGI 610, WTW, Weilheim)

Potentiometerschreiber (Metrawatt GmbH, Nürnberg)

Röntgengerät (Senograph CGR, Koch und Sterzel, Essen)

Schreiber (Colora, Lorch)

Spektralphotometer (PM 4, Zeiss, Oberkochen, BRD)

Tiefkühltruhe (Revco Ultra-Low, Model NO. ULT-1275-T, Revco Inc., Columbia, USA)

Waagen (Mettler P 1200 N, Mettler Waagen GmbH, Gießen und Mettler H 16, s.o.)

Wärmeschrank (RB 360, Heraeus GmbH, Hanau)

Wasserbad (3047, Köttermann, Häningen)

Zentrifugen (Model J-6, Beckman Instruments GmbH, München und Typ IV KS, Heraeus Christ GmbH, Osterode/Harz)

4.1.3. Chemikalien:

Äther (Hoechst AG, Frankfurt am Main)

Ampuwa (Fresenius, Bad-Homburg)

Äthylenglykolmonobutyläther (Merck, Darmstadt, BRD)

Benzoylperoxid (mit 20% Wasser, Merck, s.o.)

Bio-Gel (A 1,5 m, 50-100 mesh, Bio Rad Labor., Richmond, Kalifornien, USA)

Calciumchlorid (2382, Merck, s.o.)

Chloroform (2445, Merck, s.o.)

Delafield's Hämatoxylin (Merck, s.o.)

Dinatriumhydrogenphosphat (6579, Merck, s.o.)

Eisen-III-Chlorid (Merck, s.o.)

Eiweißglyzerin (Chroma GmbH, Stuttgart, BRD)

Eosin (Merck, s.o.)

Eukitt (Kindler, Freiburg, BRD)

Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (9001, Merck, s.o.)

Hämatoxylin Kristallin (Merck, s.o.)

Hanks'solution (L 180205, Gibco Bio Cult, Glasgow, Schottland)

Kollagenase (0,6-0,8 U/g, Nr. 17449, Serva, Heidelberg)

Kupfersulfat (2790, Merck, s.o.)

Lichtgrün gelblich (Merck, s.o.)

Lithiumchlorid (5679, Merck, s.o.)

Merck-1-Test alkal. Phosphatase (3356, Merck, s.o.)

Merckotest alkal. Phosphatase (3344, Merck, s.o.)

Merfen (Zyma GmbH, München)

Methanol (6008, Merck, s.o.)

Methacrylsäuremethylester (Merck, s.o.)

2-Methoxyäthylessigsäure (Merck, s.o.)

Natriumazid (6688, Merck, s.o.)

Natriumbikarbonat (6391, Merck, s.o.)

Natriumcitrat (6446, Merck, s.o.)

Natriumdihydrogenphosphat (6346, Merck, s.o.)

Natriumthiosulfat-5-hydrat (Merck, s.o.)

Natronlauge (1n, Merck, s.o.)

Nebacetin (Byk Gulden Lomberg, Konstanz)

Nembutal 60 (Abbott, Ingelheim)

Orange G (Chroma, s.o.)

Oxalat (15390, Serva, s.o.)

Pyrogallol (Merck, s.o.)

Plastoid (Nonylphenolpolyäthylenglycoläther, Merck)

Ponceau-Fuchsin, Masson (Chroma, s.o.)

Rinderserumalbumin (Serva Feinbiochemica, s.o.)

Salzsäure (1n, Merck, s.o.)

Silbernitrat (Baker Chemikalien, Groß-Gerau, BRD)

Titriplex (=EDTA, 8418, Merck, s.o.)

Titrisol (9975 und 9976, Merck, s.o.)

Tris (hydroxymethyl-)aminomethan (8382, Merck, s.o.)

Tyrode-Konzentrat (Uni-Apotheke, Tübingen)

WIV-Schneideflüssigkeit (WIV, Schwetzingen, BRD)

Wolframatophosphorsäure (Merck, s.o.)

Die Nummern beziehen sich auf den Katalog von 1978.

4.1.4. Sonstiges

Ethibond (H 6871, Stärke 4-0, 1,5 metric, 75 cm, Ethicon-GmbH, Norderstedt)

Klebstoff (MF Cement, XX 7000000, Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA)

Millipore-Filter (Porengröße 0,45µm, HAWP 01300, Millipore GmbH, Neu Isenburg)

Millipore-Ringe (PR 0001400, Millipore GmbH, s.o.)

Nylonnetze (Porengröße 400µm und 1000µm, B+S Seebach Filtertechnik, Vellmar)

Parafilm M (American Can Company, Dixie/Marathon, Greenwhich, USA)

Polyäthylenzuschnitte (0,025 mm stark, Kulzer & Co. GmbH, Bad Homburg, BRD)

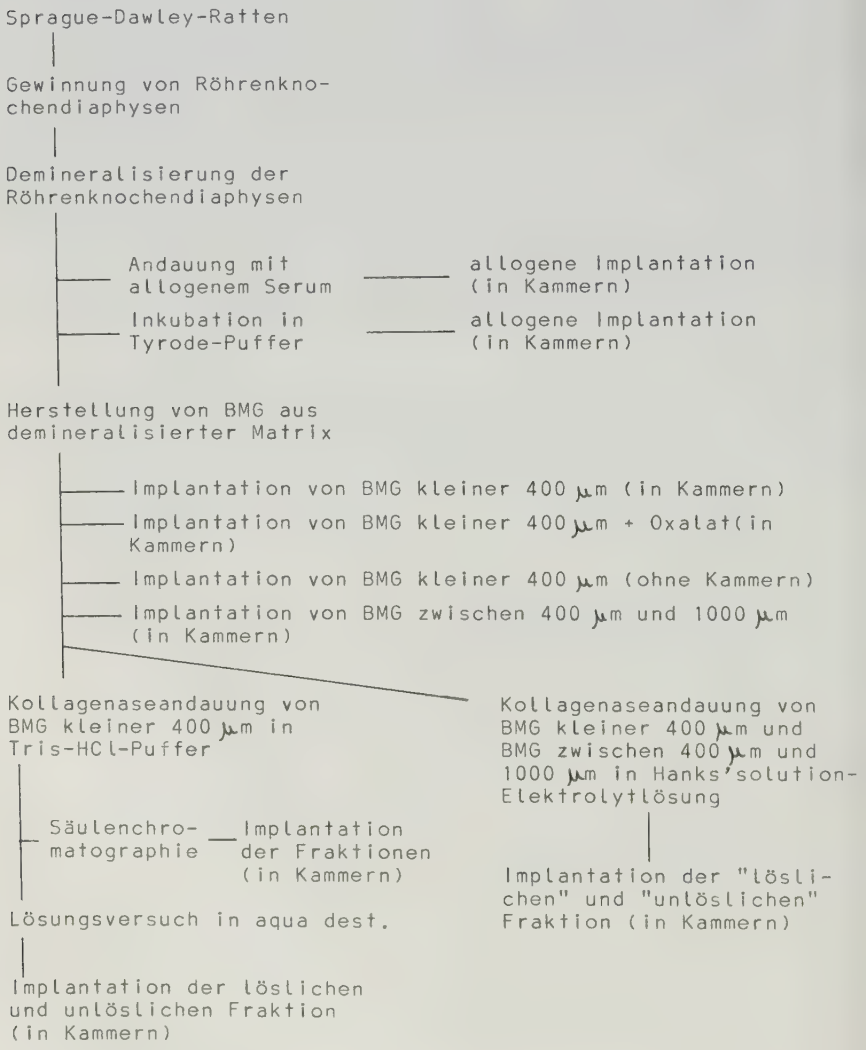
Säule (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden)

Selecta-Faltenfilter (602, Durchmesser 9 cm, Schleicher und Schüll, BRD)

Visking-Dialysierschlauch (27/32, Serva, s.o.)

4.2 Methoden

Schema 1: Arbeitsschritte-Übersicht



4.2.1. Gewinnung der Röhrenknochendiaphysen und des Serums

Die Ratten werden kurz in Ätheratmosphäre gebracht (verschließbares Glasgefäß), solange bis sie benommen sind. Dann wird eine Überdosis Nembutal (2 ml) intraperitoneal gespritzt.

Nach dem Töten der Tiere wird das Blut vom Herzen abpunktiert, bei 4000 rpm 10 Min. zentrifugiert, und das gewonnene Serum abpipettiert. Das Serum wird bei $-70\,^{\circ}C$ gelagert.

Die vier Extremitäten der Ratte werden von Fell, Fettgewebe und Muskulatur mittels Schere, Pinzette und Skalpell freipräpariert und mit einer Knochenschere vom Rumpf abgetrennt. Nachdem das Periost von den Knochen abgeschabt ist, werden die Epiphysen abgeschnitten.

Pro Ratte lassen sich auf diese Weise ca. 2,2 g (FG) Knochen gewinnen.

4.2.2. Demineralisierung der Röhrenknochendiaphysen

Entfetten: Die gewonnenen Diaphysen werden 1 Stunde zur Entfettung in ein Chloroform/Methanol-Gemisch (1:1) gegeben.

Entkalken: Der Knochen wird 24 Stunden in 0,6 normaler HCl inkubiert, wobei nach 12 Stunden die Lösung zu wechseln ist. Bereits nach 2-3 Stunden ist der Knochen so weich, daß das Knochenmark unter fliessendem Wasser herausgedrückt werden kann.

Neutralisieren: Der entkalkte Knochen wird in 0,2 molarem Phosphatpuffer (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4-Gemisch) bei pH5 2 Stunden und anschließend in aqua dest. 2 Mal 10 Min. neutralisiert.

Bei allen drei Schritten wird bei Zimmertemperatur unter ständigem Rühren inkubiert.

Das Mengenverhältnis beträgt jeweils 100 ml/g Knochen (FG). Der entkalkte Knochen wird tiefgefroren und 24 Stunden lyophilisiert. Danach ist er mit Parafilm luftdicht abgeschlossen lange haltbar (Huggins et al., 1970).

Erläuterung:

Entfetten: Mit Chloroform/Methanol werden Lipide, Lipoproteine, antimorphogenetische und zum großen Teil auch antigene Eigenschaften des Knochens entfernt (Urist et al., 1967; Urist and Strates, 1970; Urist et al., 1974 (a); Urist et al., 1975 (b)). Wird der Knochen entfettet, bevor er entkalkt wird, so ist eine größere osteoinduktive Aktivität bei der Implantation im Tierexperiment zu erwarten als bei umgekehrter Reihenfolge (Urist et al., 1972).

Entkalken: Der Knochen wird mit 0,6 normaler HCl entkalkt (Urist et al., 1967).

Dabei werden Apatitbestandteile der Knochenmatrix, säurelösliche Proteine, Phosphoproteine und zum Teil saure Mucopolysaccharide in Lösung gebracht (Urist et al., 1973).

Die induktive Aktivität der Diaphysen bleibt erhalten, da bei dieser Konzentration noch keine saure Hydrolyse oder Denaturierung von Proteinen erfolgt (Urist et al., 1974 (b)).

Neutralisieren: Die Behandlung mit Phosphatpuffer und das anschließende Waschen mit aqua dest. dient der Eliminierung von Säure (Späth, 1979).

Lyophilisieren: Durch das Gefriertrocknen werden Histocompatibilitätsantigene abgeschwächt oder inaktiviert (Chalmers, 1959).

4.2.3. Herstellung der Knochengelatine (BMG) aus demineralisierter Knochenmatrix

Die Herstellung der Knochengelatine erfolgt in vier Schritten:

a) 24 Std. Inkubation in 2 molarer Calciumchloridlösung

b) 24 Std. Inkubation in 0,5 molarer Titriplex (=EDTA)-Lösung

c) 24 Std. Inkubation in 8 molarer Lithiumchloridlösung

d) 12 Std. Inkubation in aqua dest. bei 55 ^{o} C

Die Schritte a) bis c) finden bei 4 ^{o} C statt. Alle vier Arbeitsschritte werden unter ständigem Rühren durchgeführt. Das Mengenverhältnis beträgt stets 100 ml Lösung/g (FG) Knochen, bei Schritt a) 100 ml/g (TG).

Zwischen den einzelnen Schritten wird das Material mit aqua dest. gewaschen. Zum Schluß wird die Knochengelatine tiefgefroren und 24 Stunden lyophilisiert.

Erläuterung:

Die demineralisierte Knochenmatrix ist durch die einzelnen Extraktionsschritte osteogenetisch hoch aktiv geworden, so daß die hergestellte Knochengelatine eine größere osteoinduktive Wirkung besitzt als die Ausgangssubstanz (Urist et al., 1973; Urist et al., 1974 (b); Nogami and Urist, 1975).

ad a): Calciumchlorid löst vor allem Glucoproteine, darunter vornehmlich saure Mucopolysaccharide, aus der Matrix heraus. Die Extraktion ist konzentrationsabhängig, wobei bei höheren Konzentrationen zunehmend höhermolekulare, nichtkollagene Proteine extrahiert werden (Iwata and Urist, 1972).

Zur Herstellung der Knochengelatine hat sich eine 1 bis 2 molare Calciumchloridlösung als günstig erwiesen (Urist and Strates, 1971).

ad b): Durch den Komplexbildner EDTA werden Sialo-, Phospho- und Glucoproteine sowie "Nichtapatit-"Calcium extrahiert. Das Kollagen bleibt unangetastet (Urist, 1973; Urist et al., 1973; Leaver et al., 1975 (b)).

Die EDTA-Inkubation sollte nicht länger als 5 Tage und nicht bei Temperaturen über 2° C erfolgen, da sonst die osteogenetische Aktivität des Knochenmaterials allmählich verloren geht. Hierfür wird eine BMPase in der Knochenmatrix verantwortlich gemacht (Putte and Urist, 1965; Urist, 1970).

ad c): Lithiumchlorid bewirkt eine Denaturierung von kollagenen Fibrillen, die Quervernetzung des Kollagens wird verringert ("shrinkage"). Außerdem werden höhermolekulare Proteinpolysaccharide und die hypothetische BMPase entfernt (Urist et al., 1973; Urist et al., 1976).

ad d): In diesem letzten Schritt sollen die wasserlöslichen Bestandteile beseitigt werden.

4.2.4. Herstellung der gewünschten Partikelgröße

Die demineralisierte Matrix bzw. die Knochengelatine werden in lyophilisiertem Zustand mit einer Schere grob zerkleinert, um dann in der Gefriermühle ("freezer-mill") gemahlen zu werden.

Dabei wird ein Hohlzylinder aus Metall zunächst auf einer Seite mit einem Metallstöpsel verschlossen, mit dem zu mahlenden Material und einem kleinen Eisenzylinder beschickt, auf der anderen Seite ebenfalls zugestöpselt und in die Aussparung des Elektromagneten geschoben.

Die Funktionsteile der Gefriermühle werden von flüssigem Stickstoff umgeben.

Das Material wird ca. 10 Sekunden lang bei minimaler Frequenz in der Gefriermühle gemahlen. Hierbei bewegt ein in seiner Frequenz variierbares Magnetwechselfeld den Eisenzylinder hin und her, so daß das tiefgefrorene, spröde Knochenmaterial zerschlagen wird.

Diesem Mahlvorgang schließt sich das Sieben, d.h., das Auftrennen in verschiedene Partikelgrößen, an. Mittels zweier Nylonnetze mit verschiedener Maschendichte werden Fraktionen kleiner 400 µm und zwischen 400 µm und 1000 µm gebildet. Die Teilchen größer 1000 µm werden nochmals gemahlen.

4.2.5. Kollagenaseandauung der lyophilisierten und gemahlenen Knochengelatine

Es werden Gelatinepartikel verschiedener Größe in zwei verschiedenen Medien durch Kollagenase angedaut.

4.2.5.1. Kollagenaseandauung von BMG kleiner 400 µm in Tris-HCl-Puffer

Folgender Ansatz wird wiederholt durchgeführt:

500 mg (TG) BMG + 10 ml 0,05 m Tris-HCl-Puffer + 0,5 mg Kollagenase.

Zur Kontrolle werden je einmal 100 mg BMG mit 2 ml Puffer und 0,5 mg Kollagenase mit 10 ml Puffer angesetzt.

Die Ansätze werden 22 Stunden bei 37° C im Wärmeschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird bei 5000 rpm 10 Min. zentrifugiert. Die Andauung wird mit 0,01 Mol/l EDTA gestoppt (Urist et al., 1977 (a)).

Der Überstand wird säulenchromatographisch aufgetrennt, der Niederschlag für den Lösungsversuch mit aqua dest. tiefgefroren und lyophilisiert. Beide Vorgänge werden noch ausführlich beschrieben (siehe 4.2.6.2 und 4.2.6.3).

Der 0,05 molare Tris-HCl-Puffer mit pH 7,4, der auch Calciumchlorid und Natriumazid enthält, wird bezogen auf 100 ml Puffer folgendermaßen hergestellt:

In ein Becherglas werden 610 mg Tris (hydroxymethyl-aminomethan),20 mg Natriumazid und 90 mg Calciumchlorid gegeben und mit aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. Der pH-Wert ist mit HCl auf 7,4 einzustellen.

4.2.5.2. Kollagenaseandauung von BMG kleiner 400 µm und zwischen 400 µm und 1000 µm in Hank's solution-Elektrolytlösung

Die Knochengelatine wird mit 0,0054%iger bakterieller Kollagenase 24 Stunden bei 37° C und pH 7,2 in Hank's solution-Elektrolytlösung angedaut. Während der ersten 8 Stunden wird der pH-Wert alle zwei Stunden auf 7,2 rejustiert.

Hank's solution-Elektrolytlösung enthält bezogen auf 100 ml Hank's solution 25 mMol Tris, 300 mMol Calciumchlorid und 3 mMol Natriumazid (Urist et al., 1979). Der pH-Wert wird mit HCl auf 7,2 eingestellt.

Nach beendeter Inkubation wird der Ansatz bei 4000 rpm 5 Min. zentrifugiert. Überstand und Niederschlag werden, wie folgt, weiterbehandelt (siehe 4.2.6.4.)

Erläuterung:

Das niedrige Enzym-Substrat-Verhältnis und die hohe Calciumkonzentration werden gewählt, um kontaminierende Proteasen zu unterdrücken (Mandl et al., 1958). Natriumazid wirkt antimikrobiell (Urist et al., 1979).

4.2.6. Vorbereitung der verschiedenen Implantate

Zur Einordnung in die Arbeitsschritte orientierte man sich an der Übersicht (Schema 1).

Folgende Arbeitsvorgänge werden beschrieben:

4.2.6.1. Andauung von demineralisierten Röhrenknochendiaphysen a) mit Rattenserum
b) mit Tyrode-Puffer

4.2.6.2. Säulenchromatographische Auftrennung von in Tris-HCl-Puffer mit Kollagenase angedauter BMG kleiner 400 µm

4.2.6.3. Lösungsversuch von in Tris-HCl-Puffer mit Kollagenase angedauter BMG kleiner 400 µm in aqua dest.

4.2.6.4. Weiterbehandlung der in Hank's solution-Elektrolytlösung mit Kollagenase angedauten BMG zwischen 400 µm und 1000 µm

4.2.6.5. Bau der Millipore-Kammern

ad 4.2.6.1. Andauung von demineralisierten Röhrenknochendiaphysen

Die verwendeten Matrixpartikel sind kleiner 400 µm. Acht verschließbare Reagenzgläser werden mit je 250 mg Knochenpuder versehen.

In vier Reagenzgläser werden je 5 ml des gewonnenen Rattenserums gegeben, in die übrigen vier Reagenzgläser werden je 5 ml Tyrodepuffer mit pH 7 - 7,4 pipettiert. Das entspricht einem Verhältnis von 20 ml Serum bzw. Puffer pro Gramm Knochenpuder.

Die Proben werden in einem Wasserbad bei 37° C inkubiert, wobei an jedem zweiten Tag der Puffer bzw. das Serum abzentrifugiert und erneuert werden.

Die Proben werden verschieden lange inkubiert, und zwar werden je eine mit Serum und eine mit Puffer angesetzte Probe 2, 4, 6 und 8 Tage im Wasserbad belassen.

Schema 2: Inkubationsschema

P_1 bedeutet: mit Tyrodepuffer versehene Probe 1

S_1 bedeutet: mit Serum versehene Probe 1

Probe	P_1; S_1	P_2; S_2	P_3; S_3	P_4; S_4
Inkubationszeit (Tage)	2	4	6	8

Nach Inkubationsende werden die mit Tyrode versetzten Proben 60 Stunden gegen Wasser bzw. aqua dest. dialysiert und 24 Stunden in Rundkolben lyophilisiert.

Die mit Serum angedauten Proben werden nach beendeter Inkubation mehrfach, bis der Eiweißgehalt gegen Null absinkt, mit 0,5 molarem Phosphatpuffer bei pH 7 - 7,4 gewaschen. Der Phosphatpuffer ist ein Na_2HPO_4/NaH_2PO_4-Gemisch.

Insgesamt muß ca. 40 Stunden lang ausgewaschen werden, um bei den mit Serum versetzten Proben auf einen Eiweißgehalt von ca. 23 µg/ml zu kommen.

Die Proteinbestimmung wird nach Lowry für lösliche Proteine durchgeführt (Lowry et al., 1951). Zuerst wird mit Rinderserumalbumin eine Eichkurve erstellt, auf der den gemessenen Extinktionen die jeweilige Eiweißkonzentration in µg/ml zugeordnet werden kann.

Tab. 1: Wertetabelle der Eichkurve

Eiweißkonzentration (µg/ml)	12,5	25	50	100
Extinktion bei 623 nm	0,016	0,039	0,073	0,105

Man nimmt 1 ml proteinhaltige Substanz, fügt 0,5 ml 0,3 normale Natronlauge und 5 ml Kupferreagenz unter Schütteln hinzu. Der Ansatz wird 10 Min. bei Zimmertemperatur im Dunkeln belassen.

Dann werden 0,5 ml Folin-Reagenz unter Schütteln dazugegeben, der Ansatz für 30 Min. bei Zimmertemperatur ins Dunkle gestellt und anschließend bei 623 nm gegen den Blindwert photometriert.

Blindwert: Beim Blindwert wird an Stelle proteinhaltiger Substanz Wasser eingesetzt.

Kupferreagenz: 0,1 g $CuSO_4$ mal 5 H_2O werden mit 20 ml 1%iger Na-Citratlösung versetzt. 1 ml dieser angefertigten Lösung wird mit 50 ml 2%iger Na_2CO_3-Lösung gemischt.

Diese Lösung muß am Tage der Proteinbestimmung frisch angesetzt werden.

Folin-Reagenz: Zu einem Teil "Folin-Reagenz" (Merck) werden zwei Teile aqua dest. gegeben.

Erläuterung:

Mit allogenem Serum bzw. Puffer werden die Proben bei 37° C inkubiert, um in vitro einen hypothetischen Proteinkomplex, der eine morphogenetische Komponente und eine Calcifizierung bewirkende Komponente besitzen soll, zu spalten. Möglicherweise wird die morphogenetische Komponente, genannt BMP, zerstört (Urist et al., 1977 (a)).

ad 4.2.6.2. Säulenchromatographische Auftrennung von in Tris-HCl-Puffer mit Kollagenase angedauter BMG kleiner 400 µm

Material: Auf die Säule aufgetragen wird der nach der Kollagenaseandauung mit Tris-HCl-Puffer und mit EDTA versetzte Überstand, wie erwähnt.

Säulenvorbereitung: Die Säule, der obere und untere Adapter der Säule werden mit aqua dest. gereinigt. Der untere Adapter wird angeschraubt und in seiner Stellung nicht mehr verändert. Die Säule steht senkrecht.

Jetzt werden ca. 10 cm der Säule mit Tris-EDTA-Puffer gefüllt, wobei der Puffer an der Säulenwand entlang laufen soll.

Das vorbereitete Puffer-Gel-Gemisch wird über einen Trichter, an dessen Ausfluß ein Schlauch angebracht ist, und eine Einfüllröhre in die Säule vorsichtig portionsweise eingefüllt, so daß keine Luftblasen entstehen. Gleichzeitig wird der bis dahin abgeklemmte abführende Schlauch am Säulenende geöffnet, und der darin abfließende Puffer in einem Gefäß aufgefangen.

Das Gel setzt sich langsam ab und muß stets mit Puffer feucht gehalten werden. Falls Risse oder Luftblasen entstehen, muß die Säule neu angesetzt werden.

Bei der gefüllten Säule soll der Abstand zwischen oberem Gelrand und oberem Säulenende 5 bis 10 cm betragen. Die Säule wird nun bis zum Überlaufen mit Puffer aufgefüllt, damit beim Anbringen des oberen Adapters keine Luftblasen eindringen. Aus demselben Grund soll bereits vor dem Anschrauben des oberen Adapters durch den zuführenden Schlauch mittels der peristaltischen Pumpe Puffer fließen. Der obere Adapter wird in 1 bis 2 cm Abstand vom oberen Gelrand fixiert.

Vor Auftragung der Probe wird die Säule 6 Stunden lang mit Puffer äquilibriert, d.h., Puffer wird zu- und abgeführt. Die Pumpe wird mit der Drehzahl 1 betrieben.

Vorbereitung des Puffer-Gel-Gemisches: Das Gel wird mit reichlich Tris-EDTA-Puffer versetzt und entgast, bis keine Luftblasen mehr aufsteigen.

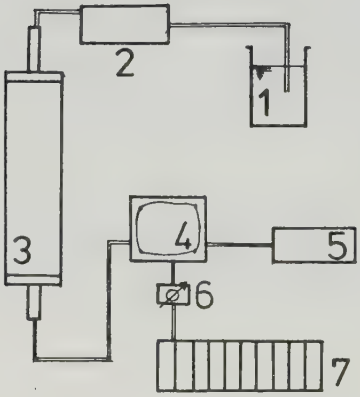
Berechnung der benötigten Gelmenge:

πr^2 mal h = $1{,}25^2$ mal 3,14 mal 80 (cm^3) = 393 cm^3

Auftragung der Probe auf die Säule: Die Probe wird über den zum oberen Säulenende führenden Schlauch mittels der peristaltischen Pumpe angesaugt.

Aufzeichnung und Sammeln der Fraktionen:
Die beim Durchwandern der Säule entstehenden Fraktionen werden durch einen Monitor geleitet und anschließend von einem Fraktionensammler in Reagenzgläsern aufgefangen.

Abb. 1: Säulenapparatur: 1 Puffer
2 Pumpe
3 Säule
4 Monitor
5 Recorder
6 Volumen-Zeit-Messung
7 Fraktionensammler



Der Monitor besteht aus einer Lichtquelle mit einem Filter für 254 und 276 nm Durchlaß und einer Photozelle. Das Säuleneluat wird von Licht beider Wellenlängen durchstrahlt. Ein Teil davon wird absorbiert. Der Rest wird als Transmission gemessen und von einem Schreiber als Extinktion kontinuierlich aufgezeichnet. Mittels dieser graphischen Darstellung lassen sich die einzelnen Fraktionen und ihre Absorption bei den verwendeten Wellenlängen erkennen.

Das Säuleneluat wird über ca. 33 Stunden aufgezeichnet und gesammelt.

Erläuterung:

Die beschriebene Gelfiltration gehört zur Klasse der Verteilungschromatographie, wobei die Gelfiltration mehr nach der Größe als nach der Löslichkeit oder Flüchtigkeit der betrachteten Moleküle auftrennt.

Es wird unterschieden zwischen einer mobilen Phase, hier der Tris-EDTA-Puffer, und einer stationären Phase, hier der vom Agarose-Gel festgehaltene Puffer.

Die großen Moleküle strömen an den Gelkörnchen schnell vorbei und durchlaufen somit rasch die Säule, während die kleinen Moleküle in die Gelphase eindringen und dort verzögert in Maschen und Kanälen abwärts wandern.

ad 4.2.6.3. Lösungsversuch von in Tris-HCl-Puffer mit Kollagenase angedauter BMG kleiner 400 µm in aqua dest.

Die in Kollagenase inkubierte aber unlösliche, lyophilisierte Knochengelatine wird in reichlich aqua dest. unter Rühren bei Zimmertemperatur 1 Stunde inkubiert.

Danach wird der Ansatz bei 5000 rpm 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert, in Glaskolben im Kryostat tiefgefroren und lyophilisiert. Der Niederschlag wird in Petrischalen ausgebreitet, tiefgefroren und ebenfalls lyophilisiert.

ad 4.2.6.4. Weiterbehandlung der in Hank's solution-Elektrolytlösung mit Kollagenase angedauten BMG zwischen 400 µm und 1000 µm

Der nach dem Zentrifugieren bestehende Überstand wird abpipettiert und 24 Stunden gegen Ampuwa dialysiert. Der im Dialysierschlauch verbleibende Rest wird tiefgefroren und 24 Stunden lyophilisiert.

Der durch das Zentrifugieren entstehende Niederschlag wird drei Mal mit Ampuwa gewaschen und anschließend im gefrorenen Zustand 24 Stunden lyophilisiert.

Durch das Dialysieren bzw. Waschen mit Ampuwa soll der Puffer entfernt werden.

Esentsteht eine Fraktion in Kollagenase "lösliche BMG" und eine Fraktion in Kollagenase "unlösliche BMG".

ad 4.2.6.5. Bau der Millipore-Kammern

Es werden zwei verschiedene Kammertypen verwendet. Der eine Kammertyp besteht aus zwei aufeinandergeklebten Millipore-Ringen, die auf jeder Seite mit je einem Millipore-Filter verschlossen werden.

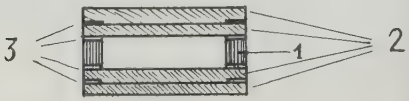
Der andere Kammertyp besteht aus nur einem Millipore-Ring, der auf beiden Seiten mit je zwei Millipore-Filtern verschlossen wird..

Die Ringe und Filter werden mit "MF Cement" miteinander verbunden.

Abb. 2: Kammertypen: 1 Millipore-Ring
2 Millipore-Filter
3 "MF Cement"

Typ 1

Typ 2



Erläuterung:

Der Sinn der Implantation in Kammern besteht darin, zellvermittelte Mechanismen und das Einwachsen von Blutgefäßen des umgebenden Muskelgewebes auszuschliessen (Urist et al., 1977 (b)).

Die Kammern und Filter werden vor der Füllung mit Knochenmaterial mit Äthylenoxid sterilisiert und anschließend entlüftet.

4.2.7. Operationstechnik

4.2.7.1. Narkose

Die Ratten werden in Äther kurz betäubt und anschliessend mit 0,1 ml Nembutal/100 g Körpergewicht intraperitoneal narkotisiert.

4.2.7.2. Implantation

Nach Rasur der Bauchhaut wird die narkotisierte Ratte auf einer Korkplatte auf dem Rücken liegend an allen vier Extremitäten mit Nadeln fixiert.

Das Operationsgebiet wird mit Merfen desinfiziert. Man legt 2 cm unterhalb des Rippenbogens und beidseits der Medianlinie einen 2 cm langen Hautschnitt an. Das Bindegewebe wird von der Faszie des M. obliquus externus abdominis nach beiden Seiten abpräpariert. Nun wird der Muskel mit seiner Faszie auf eine Länge von 10 mm längs durchtrennt. Zwischen M. obliquus externus abdominis und M. obliquus internus abdominis wird nach lateral eine Tasche gebildet, die das Implantat gerade aufnehmen kann. Bei der Bildung der Muskeltasche hat sich die stumpfe Präparation mit kleinen Tupfern bewährt.

Nach Einbringung des Implantates werden in jede Muskeltasche zwei Tropfen Nebacetinlösung geträufelt.

Abb. 3: Die Mm. obliqui externi abdominis sind in Längsrichtung durchtrennt.

Abb. 4:

Blick in eine präparierte Muskeltasche.

Der M. obl. ext. abd. wird mit einer Pinzette abgehoben.

Bacitracin beeinflußt den Induktionsvorgang nicht (Urist et al., 1975 (b)).

Die Muskeltasche und die Bauchhaut werden jeweils mit einer fortlaufenden Naht verschlossen.

Zum Abschluß wird das Operationsgebiet nochmals mit Merfen gesäubert.

Bis zum Tage der Explantation, also 17 bzw. 21 Tage lang, werden die operierten Tiere in gekennzeichneten Käfigen gehalten.

4.2.7.3. Explantation

Die Ratten werden mit 2 ml Nembutal intraperitoneal getötet. Die Bauchhaut wird den bei der Implantation gesetzten Nähten entlang eröffnet.

Abb. 5:

Die Wunden sind gut verheilt.

Die Nähte sind beidseits der Medianlinie erkennbar.

Abb. 6: Nachdem die Bauchhaut durchtrennt ist, kommt das Implantat zum Vorschein.

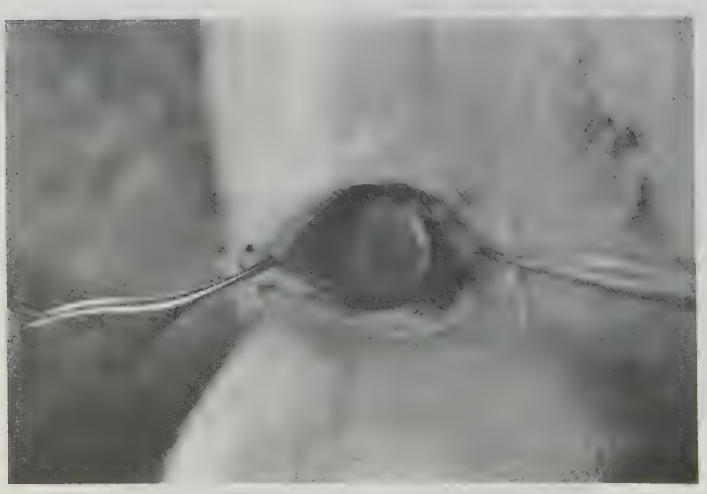
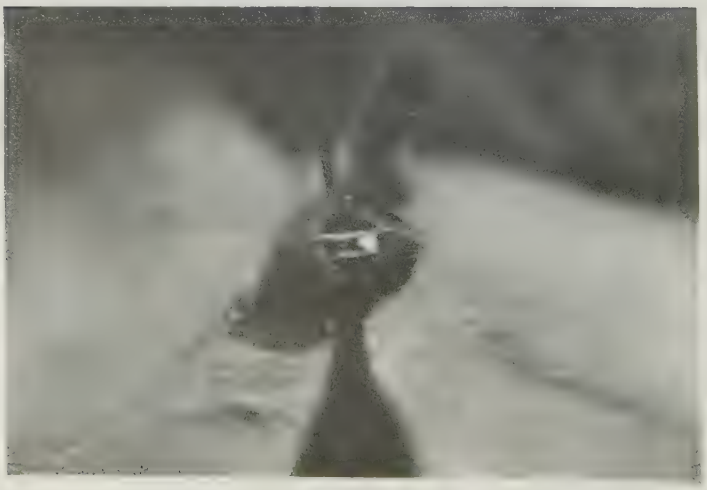


Abb. 7: Blick in eine eröffnete Muskeltasche. Man sieht eine Kammer vom Typ 2.



Die Muskeltaschen werden großzügig herausgeschnitten. Nun wird das Explantat bis auf eine dünne, umhüllende Muskelschicht von Muskulatur freipräpariert.

Abb. 8: Explantierte, von Muskulatur umgebene Kammer im Größenvergleich mit einer Rattenhinterpfote.

Die Muskulatur, aus der anschließend die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) bestimmt wird, muß sofort gekühlt werden, um einen Aktivitätsverlust des Enzyms zu vermeiden.

Ein Teil der Explantate wird in 40%igen Alkohol gelegt und einer histologischen Untersuchung unterzogen.

4.2.8. Implantat - Serien

4.2.8.1. Serie 1: In Serum bzw. Puffer inkubierte demineralisierte Knochenmatrix

Insgesamt werden je vier Proben demineralisierte Knochenmatrix für die Serum- bzw. Pufferinkubation vorgesehen. Von jeder Probe werden wiederum vier Untergruppen gebildet, die 2, 4, 6 bzw. 8 Tage inkubiert werden.

Die Implantation erfolgt in Kammern vom Typ 1. Die Implantate verbleiben drei Wochen in den Ratten. Die Explantate werden geröntgt.

Aus dem die Kammer umgebenden Muskelgewebe wird die Aktivität der AP bestimmt.

4.2.8.2. Serie 2: Säulenchromatographisch aufgetrennte Fraktionen

Bei der chromatographischen Auftrennung der BMG kleiner 400 µm, die mit Kollagenase in Tris-HCl-Puffer angedaut wurde, ergeben sich zwei Peaks. Diese zwei gesammelten Fraktionen werden 24 Stunden gegen Ampuwa dialysiert, um den Puffer zu verdrängen, und anschliessend lyophilisiert.

Drei Proben von Peak I und drei Proben von Peak II werden in Kammern vom Typ 2 implantiert. Jede Kammer enthält ca. 10 mg der jeweiligen Fraktion. Die Implantate bleiben 17 Tage in den Tieren.

4.2.8.3. Serie 3: Knochengelatine kleiner 400 µm

Insgesamt werden 8 Kammern gefüllt mit BMG kleiner 400 µm, 2 Kammern mit BMG kleiner 400 µm und Oxalat und 8 Proben BMG kleiner 400 µm ohne Kammern implantiert.

Die Proben ohne Kammern bleiben 22 Tage, alle anderen Implantate 17 Tage in den Versuchstieren.

Verwendung finden hier wie in allen folgenden Serien nur noch Kammern vom Typ 2.

4.2.8.4. Serie 4: In aqua dest. lösliche und unlösliche Fraktion Kollagenase angedauter BMG kleiner 400 µm

Nach dem Lösungsversuch in aqua dest. werden 6 Proben des lyophilisierten Überstandes und 8 Proben des Niederschlags in Kammern implantiert. Der Kammerinhalt beträgt je ca. 20 mg.

17 Tage später wird explantiert.

4.2.8.5. Serie 5: Knochengelatine zwischen 400 µm und 1000 µm

Dieses Material ist außerhalb der Kammer getestet und hochaktiv. Es werden 6 Implantate in Kammern in die Versuchstiere eingebracht und 24 Tage in ihnen belassen.

Bei allen Implantaten mit BMG befinden sich ca. 20 mg in jeder Kammer.

4.2.8.6. Serie 6: In Kollagenase lösliche und unlösliche Fraktion von BMG zwischen 400 µm und 1000 µm

Es werden eine Probe der in Kollagenase unlöslichen BMG und zwei Proben lösliche BMG in Kammern implantiert.

Die Implantate verbleiben 17 Tage in den Versuchstieren.

Die zur Kollagenaseandauung verwendete Knochengelatine ist außerhalb der Kammer getestet und aktiv.

4.2.8.7. Serie 7: Leere Kammern

Es werden 8 leere Kammern vom Typ 2 zur Leerwertbestimmung implantiert und 17 Tage in den Ratten belassen.

4.2.9. Auswertung der Explantate

4.2.9.1. Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Die gekühlten Explantate, d.h., die das Implantat umgebende Muskulatur, werden gewogen und mit einer Schere grob zerkleinert, damit sich keine langen, faserigen Strukturen beim anschließenden Homogenisieren um das Messer wickeln.

Zu den zerkleinerten Explantaten werden jeweils 4 ml aqua dest. in einen speziellen Homogenisatorglaskolben gegeben. Die Proben werden 5 Min. bei 10 000 rpm im Messerhomogenisator homogenisiert. Der Glaskolben wird während des Homogenisierens mit Eis und fliessendem kaltem Wasser gekühlt.

Das Homogenisat wird in ein Reagenzglas gefüllt, der Glaskolben wird mit 1 ml aqua dest. ausgespült, und die Spülflüssigkeit wird zum Reagenzglasinhalt hinzugegeben.

Abb. 9:

Das Explantat ist mit der Schere grob zerkleinert und mit 4 ml aqua dest. versehen.

Abb. 10:

Das Explantat von Abb. 10 ist homogenisiert.

Die Homogenisate werden 5 Min. bei 3000 rpm und 4° C zentrifugiert.

Aus dem Überstand wird mit dem Merckotest "Alkalische Phosphatase"die Aktivität der AP bestimmt.

Der Ansatz lautet: 1 ml Testansatz + 20 µl Überstand

Der Testansatz enthält:

10 mmol/l p-Nitrophenylphosphat als Substrat

0,5 mmol/l Magnesiumchlorid

1,0 mol/l Diäthanolamin-HCl-Puffer pH 9,8 zur Konstanthaltung des pH-Optimums (Walter und Schütt, 1970)

Magnesiumionen aktivieren die alkalische Phosphatase (Schüssler, 1968).

Die AP spaltet p-Nitrophenylphosphat in p-Nitrophenol und Phosphat (Bessey et al., 1946). Das Extinktionsmaximum verschiebt sich hierbei von 310 nm (p-Nitrophenylphosphat) zu 405 nm (p-Nitrophenol).

Die Extinktionszunahme wird nach 1 Min. bei 25 °C, einer Wellenlänge von 405 nm und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen.

Ein Potentiometerschreiber zeichnet bei einer Papiergeschwindigkeit von 30 mm/Min. die Extinktionszunahme graphisch auf. Man erhält eine Gerade, deren Steigung der Extinktionszunahme pro Minute entspricht (Δ E/Min.).

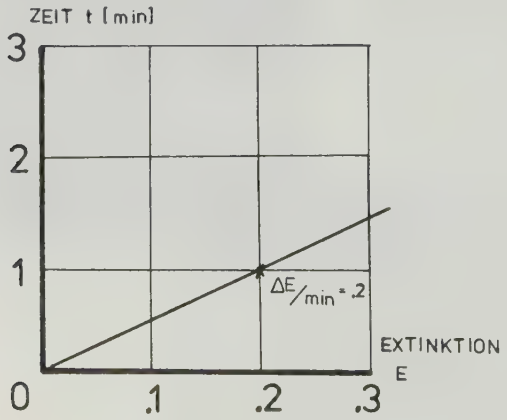


Abb. 11: Beispiel der graphischen Darstellung der Extinktionszunahme bei der Bestimmung der AP.

Zur Berechnung der Volumenaktivität (U/l) gilt folgendes (Beipackzettel zum Merckotest):

Volumenaktivität (U/l) = ΔE/Min. x 2754 (U/l)

1 Unit (1 U) entspricht derjenigen Menge AP, die bei 37 °C in einer Minute 1 µmol p-Nitrophenol freisetzt. Aus der Volumenaktivität läßt sich die in jedem der Homogenisate (5 ml) enthaltene absolute Enzymmenge bezogen auf ihr Frischgewicht berechnen:

$$\text{Enzymaktivität (U/g)} = \frac{\text{Volumenaktivität} \times 5}{1000 \times G} \quad \text{(U/g)}$$

G ist das jeweilige Frischgewicht der Explantate. Der um 20 µl verminderte Rest der Proben wird tiefgefroren.

4.2.9.2. Qualitativ radiologische Bestimmung des Calciumgehaltes

Die Explantate der Serie 1, also Kammern mit umgebender Muskulatur, werden mit einem Mammographen in der Einstellung 30 kv und 30 mA bei automatischer Belichtungseinstellung auf die Strahlenabsorption untersucht.

4.2.9.3. Histologie

4.2.9.3.1. Fixieren und Einbetten

Die Explantate, bestehend aus Kammer und Muskulatur, werden drei Tage in 40%igem Alkohol fixiert.

Um die Millipore-Ringe der Kammern aufzulösen, wird ein kleiner Schnitt an der Muskeltasche des Explantates angebracht, und dieses 24 Stunden in Chloroform gelegt.

Die Einbettung in Methylmethacrylat (Boellaard und Hirsch, 1959) erfolgt in der 1979 von Späth praktizierten Weise.

Ablauf:	Äthanol 80 %	24 Stunden
	Äthanol 96 %	24 Stunden
	Äthanol 100 %	24 Stunden
	MMA I	24 Stunden
	MMA II	24 Stunden
	MMA III	4 Stunden

MMA I ist reines Methylmethacrylat.

Mit MMA II wird ein Gemisch bezeichnet, bei dem in 100 ml MMA 2 g Dibenzoylperoxid gelöst sind.

MMA III besteht aus 100 ml MMA, 4 g Dibenzoylperoxid und 25 ml Plastoid N.

Die Einbettungsgläschen werden mit Parafilm luftdicht verschlossen und zur Abführung der Polymerisationswärme in ein Wasserbad von 32 ^{o} C gestellt. Tritt die Polymerisation nach 24 Stunden noch nicht ein, so wird die Temperatur des Wasserbades auf 40^{o} C erhöht. Spätestens nach Ablauf weiterer 24 Stunden führt dies zur gewünschten Reaktion.

Nach dem Zerschlagen der Gläschen werden die Markierungen direkt in die Blöckchen eingeritzt.

4.2.9.3.2. Herstellung von Dünnschnitten

Die Blöckchen werden auf der Präparatseite plangefeilt, in ein Mikrotom eingespannt und justiert.

Das Mikrotom besitzt ein ultrahartes Spezialmesser mit Härte d. Während des Schneidens werden Block und Messer ständig mit WIV-Schneideflüssigkeit bepinselt. Die 7μ dicken Schnitte werden vom Messer weg für ca. eine Minute in mit einigen Tropfen Eisessig versetzten 96%igen Alkohol gebracht. Dies dient der Streckung und leichten Anentkalkung, was eine bessere Anfärbbarkeit bewirkt.

Auf Objektträgern wird je ein Tropfen Eiweißglyzerin zum Aufkleben der Schnitte ausgestrichen (Romeis,1968). Die Schnitte werden mit einem Pinsel auf die Objektträger aufgezogen und mit je einem Tropfen Äthylenglycolmonobutyläther als Streckflüssigkeit überschichtet.

Die Objektträger werden mit speziell angepaßten Polyäthylenzuschnitten bedeckt. Die Zuschnitte werden durch Abrollen eines zylindrischen Metallstiftes zur Vermeidung von Falten angepreßt.

Zur 48 stündigen Trocknung im Wärmeschrank bei 65° C werden mehrere Objektträger aufeinandergelegt und mit Schraubzwingen zwischen zwei Holzplättchen eingespannt. Nach dem Trocknen kleben die Schnitte auf dem Objektträger so fest, daß die Polyäthylenzuschnitte vorsichtig abgezogen werden können.

4.2.9.3.3. Ausbettung

Die Schnitte werden 30 Min. in 2-Methoxymethylessigsäure aus dem Methylmethacrylat ausgebettet.

4.2.9.3.4. Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Die Färbung wird in Anlehnung an Schmidt-Neuerburg und Wilde (1973) vorgenommen.

Ablauf:	Weigert-Eisenhämatoxylin	15 Min.
	stehendes Leitungswasser	15 Min.
	1%ige Essigsäure	1 Min.
	Goldner I (Ponceau-Fuchsin)	8 Min.
	1%ige Essigsäure	1 Min.
	Goldner II	8 Min.
	1%ige Essigsäure	1 Min.
	Goldner III	8 Min.
	1%ige Essigsäure	1 Min.

Erläuterung:

Weigert-Eisenhämatoxylin setzt sich zusammen aus Lösung A (1 g Hämatoxylin in 100 ml 96%igem Alkohol) und Lösung B (1,16 g FeCl, 98 ml aqua dest., 1 ml HCl) im Verhältnis 1:1.

Das stehende Leitungswasser dient dem Bläuen.

Goldner II besteht aus 45 g Phosphorwolframsäure, 900 ml aqua dest. und 18 g Orange G.

Goldner III ist ein Gemisch aus 1,8 g Lichtgrün, 900 ml aqua dest. und 1,8 ml Eisessig.

Die gefärbten Schnitte werden kurz in absoluten Alkohol und Xylol eingebracht und dann mit Eukitt und Deckgläschen unter Vermeidung von Luftbläschen eingedeckt. Bis zum Erstarren des Eukitts werden sie mit Bleiklötzchen beschwert.

5. Ergebnisse

5.1 Gewichtsverlauf bei der Bearbeitung des frischen Knochens

Die Diaphysen der langen Röhrenknochen der Ratten wiegen nach sauberer Präparation durchschnittlich 2,2 g (FG mit Knochenmark).

Verwendet werden die Diaphysen folgender Extremitätenknochen: Femur, Tibia, Fibula, Humerus, Radius, Ulna.

Das Trockengewicht der demineralisierten Matrix beträgt noch ca. ein Siebtel, entsprechend 14,3 % des FG des Ausgangsknochens.

Weitere 33 % des TG des entkalkten Knochens gehen bei der Herstellung der Knochengelatine verloren.

Beim Mahlen der Knochengelatine mit der "freezer mill" liegt die Ausbeute von Partikeln zwischen 400 µm und 1000 µm bei 50 %, die Menge der Partikel kleiner 400 µm beträgt 49,8 %. Die restlichen 0,2 % gehen verloren.

Bei der Kollagenaseandauung von BMG kleiner 400 µm in Tris-HCl-Puffer gehen von 500 mg BMG 150 mg in Lösung, entsprechend 30 %. 70 % sind also unlöslich.

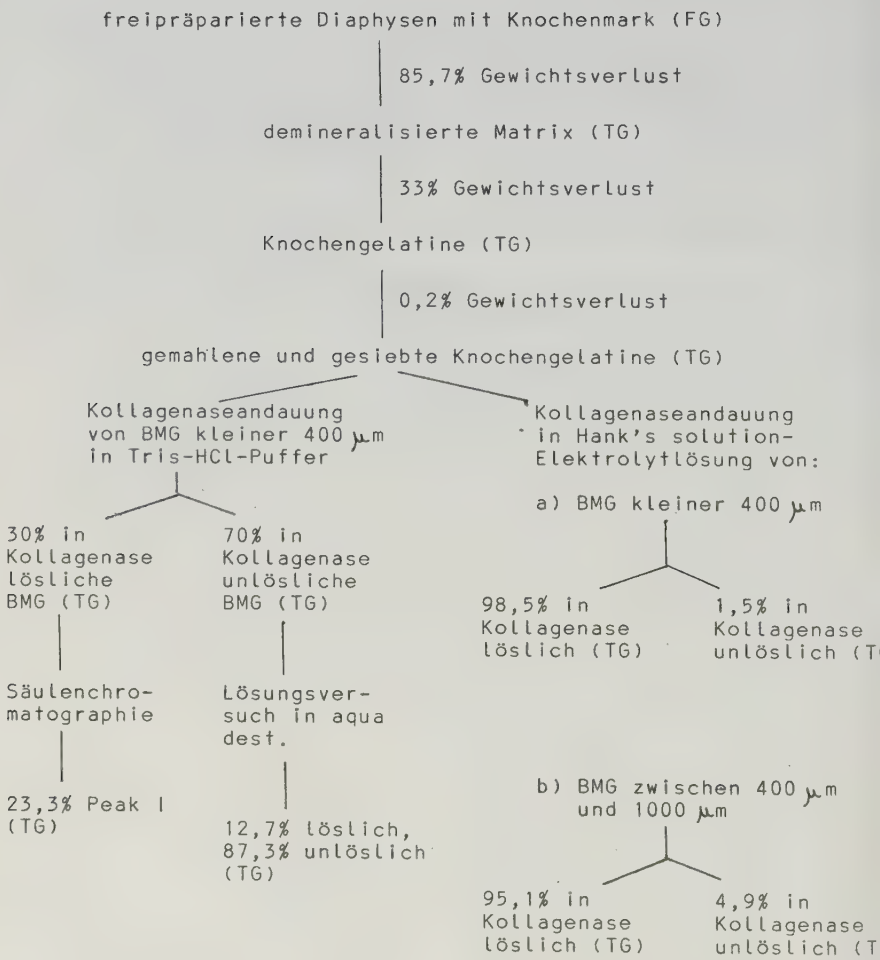
Aus diesen in Kollagenase löslichen 150 mg BMG kleiner 400 µm, die auf die Säule aufgebracht werden, lassen sich 35 mg einer hochmolekularen Fraktion (Peak I), entsprechend 23,3 % gewinnen.

Von dem in Kollagenase unlöslichen Anteil der BMG kleiner 400 µm erweisen sich 12,7 % in aqua dest. als löslich.

Bei der Kollagenaseandauung in Hank's solution-Elektrolytlösung ergeben sich folgende Relationen:

- Bei der Andauung von BMG kleiner 400 µm sind nur 1,5 % unlöslich. 98,5 % gehen also in Lösung.
- Bei der Andauung von BMG zwischen 400 µm und 1000 µm bleiben 4,9 % unlöslich. 95,1 % gehen in Lösung.

Die Ausbeute an löslicher BMG fällt dennoch gering aus, was dem Dialysiervorgang angelastet werden kann. Wahrscheinlich ist der verwendete Dialysierschlauch in seiner Porengröße ungeeignet. Die Verluste erreichen eine Größenordnung von über 90 %.



Schema 3: Gewichtsverlauf in Prozent bei der Bearbeitung der Röhrenknochendiaphysen.

5.2 Ergebnisse der Serie 1

Serie 1 bezeichnet die Implantate, die aus in allogenem Serum bzw. Tyrode inkubierter demineralisierter Knochenmatrix bestehen. Die Partikel sind kleiner 400 µm.

5.2.1. Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Es ergeben sich die in Tabelle 2 aufgelisteten Werte.

Proben	AP in U/g (FG)				Mittelwerte
S 1	3,82	4,23	6,63	3,60	4,57 ± 1,40
S 2	5,03	2,83	3,79	11,14	5,70 ± 3,74
S 3	9,57	5,28	5,55	12,95	8,34 ± 3,65
S 4	11,01	4,26	7,23	3,97	6,62 ± 3,28
P 1	5,61	4,59	4,70	4,07	4,74 ± 0,64
P 2	4,22	2,63	2,62	4,24	3,43 ± 0,93
P 3	5,21	1,31	1,49	5,19	3,30 ± 2,20
P 4	1,85	2,32	4,70	8,82	4,42 ± 3,19

Tab. 2: Aktivität der AP in U/g (FG) der Serie 1.

S: Serum

P: Puffer

S 1 bzw. P 1: mit Serum bzw. Puffer 2 Tage inkubierte Probe

S 2 bzw. P 2: 4 Tage Inkubation

S 3 bzw. P 3: 6 Tage Inkubation

S 4 bzw. P 4: 8 Tage Inkubation

Mittelwert S 1 - S 4 : 6,31 ± 3,17

Mittelwert P 1 - P 4 : 3,97 ± 1,91

Zwischen der Aktivität der in Serum und der in Puffer inkubierten Proben besteht nach dem t-Test für unverbundene Stichproben bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von a = 0,05 ein signifikanter Unterschied.

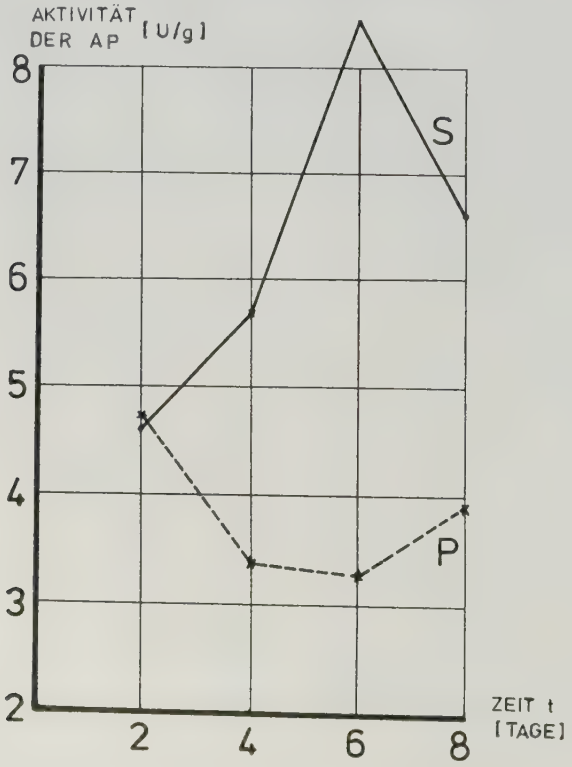


Abb. 12: Graphische Darstellung der AP-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in Puffer (P) bzw. Serum (S).

5.2.2. qualitativ radiologische Calciumbestimmung

Nach der Explantation werden die Kammern mit den sie bergenden Muskeltaschen geröntgt.

Dabei sind auf den Aufnahmen der in Serum inkubierten Proben nach drei Wochen bei allen Explantaten Verdichtungen zu sehen, während diese bei 15 von 16 in Puffer inkubierten Proben nicht auftauchen.

Die punkt- und kommaförmigen Verdichtungen weisen auf eine erfolgte Calcifizierung hin.

Abb. 13: Explantat einer 2 Tage in Serum inkubierten Probe.

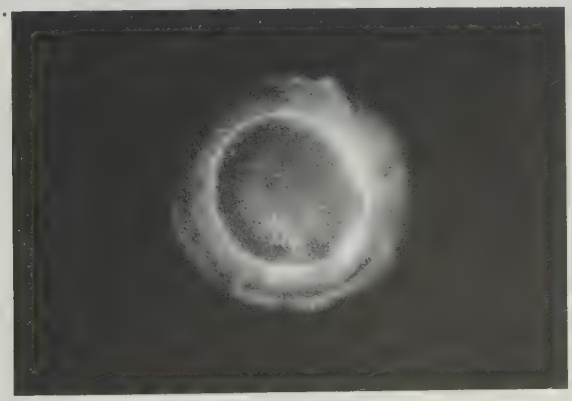


Abb. 14: Explantat einer 4 Tage in Serum inkubierten Probe.

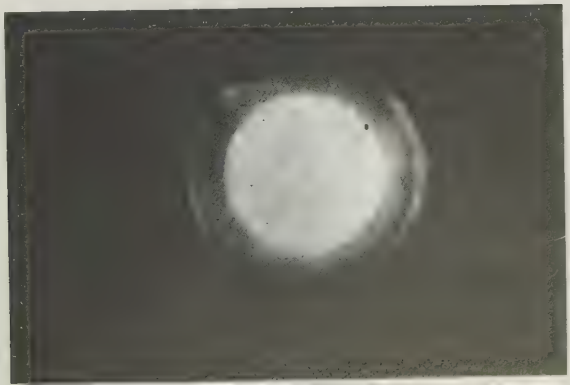


Abb. 15: Explantat einer 6 Tage in Serum inkubierten Probe.

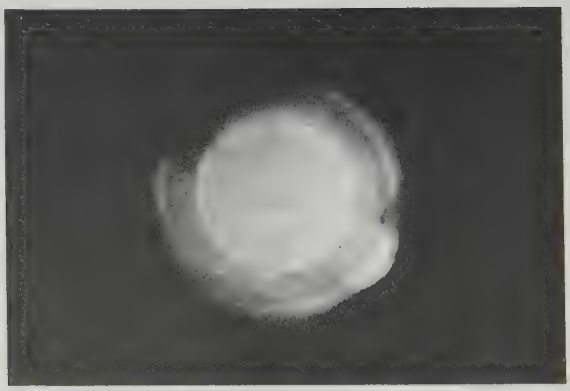


Abb. 16: Explantat einer 8 Tage in Serum inkubierten Probe.

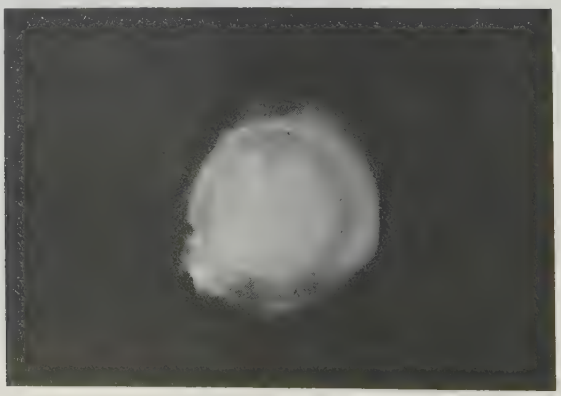
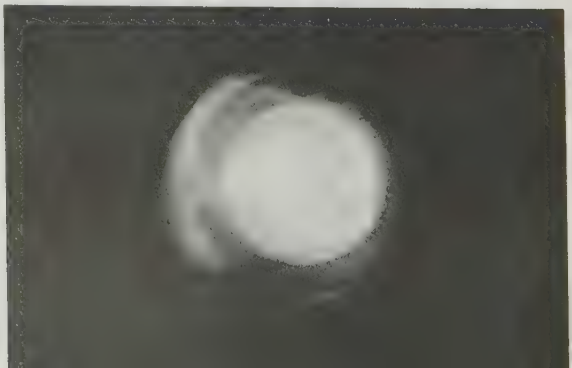


Abb. 17: Explantat einer in Puffer inkubierten Probe.



5.3 Ergebnisse der Serie 2

Die Serie 2 umfaßt die aus dem Überstand der in Tris-HCl-Puffer durch Kollagenase angedauten Knochengelatine gewonnenen Fraktionen.

Zunächst werden die Ergebnisse der säulenchromatographischen Auftrennung des in Kollagenase löslichen BMG-Anteiles dargestellt.

5.3.1. Säulenchromatographische Analyse der in Tris-HCl-Puffer mit Kollagenase angedauten BMG kleiner 400 µm.

Die in 2 ml gelöste, auf die Säule aufgetragene Probe durchläuft in ca. 33 Stunden die Säule. Die Absorption der aufgetrennten Fraktionen wird mit Licht der Wellenlängen von 254 nm und 276 nm gemessen. Sowohl bei 276 nm als auch bei 254 nm zeigen die aufgezeichneten Kurven je zwei dieselbe Fraktion identifizierende Peaks.

Die Kurvenverläufe weisen deutlich darauf hin, daß die aufgebrachte Probe aus einer hochmolekularen Fraktion, entsprechend Peak I, und einer niedermolekularen Fraktion, entsprechend Peak II, besteht. Diese Peaks fehlen bei den Kontrolläufen, welche einmal mit BMG kleiner 400 µm und Puffer und einmal mit Kollagenase und Puffer angesetzt werden.

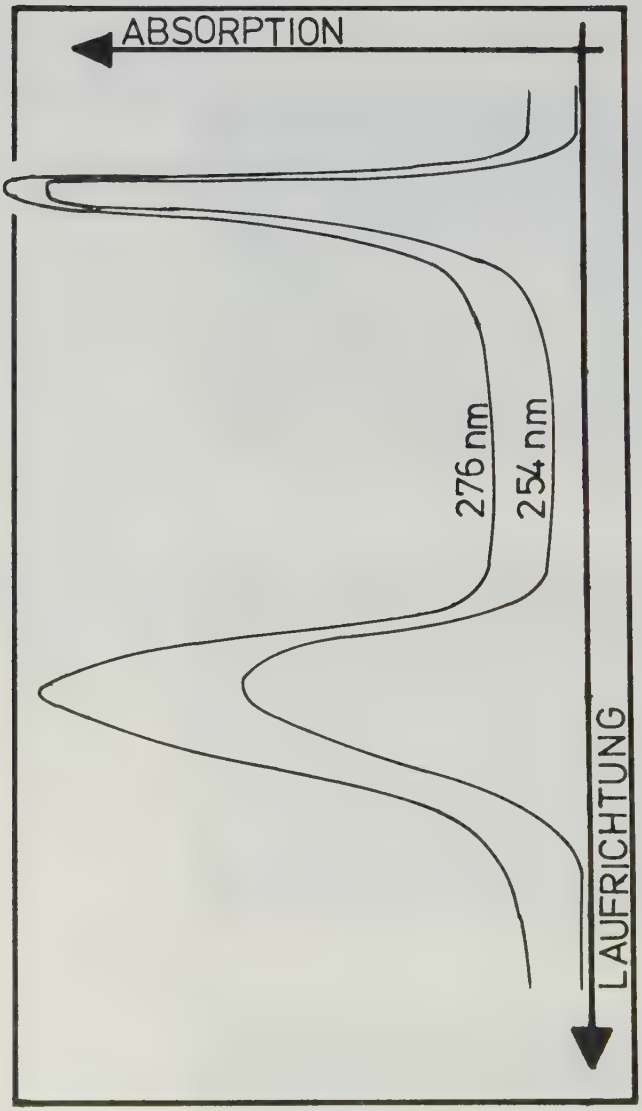


Abb. 18: Extinktionsverlauf des säulenchromatographisch aufgetrennten, in Kollagenase löslichen BMG-Anteiles.

5.3.2. Aktivität der AP nach Explantation der gesammelten Fraktionen

Es werden jeweils drei Explantate des Peak I und Peak II nach einer Implantat-Verweildauer von 17 Tagen untersucht.

Peak I: AP (U/g)	Peak II: AP (U/g)
0,70	0,98
0,67	0,29
2,20	0,29
Mittelwert:	Mittelwert:
1,19 ± 0,88	0,52 ± 0,40

Tab. 3: Bestimmung der AP in U/g (FG) der säulenchromatographisch aufgetrennten Fraktionen.

5.4 Ergebnisse der Serie 3

Die Serie 3 umfaßt Implantate von BMG kleiner 400 µm. Es werden pro Implantat ca. 20 mg BMG eingesetzt. Bei den zwei Kammern, bei denen der BMG zusätzlich Oxalat beigemischt wird, befinden sich ca. 12 mg Oxalat in jeder Kammer.

5.4.1. Aktivität der AP der in Kammern vom Typ 2 implantierten BMG kleiner 400 µm

BMG kleiner 400 µm	BMG kleiner 400 µm mit Oxalat
1,19 1,02 0,98 1,22 2,99 1,01 1,20 1,71	3,41 1,14
Mittelwert: 1,42 ± 0,68	Mittelwert: 2,28 ± 1,61

Tab. 4: Aktivität der AP in U/g (FG) der in Kammern implantierten BMG kleiner 400 µm bzw. BMG kleiner 400 µm mit Oxalat.

5.4.2. Aktivität der AP der ohne Kammern implantierten BMG kleiner 400 µm

Die Aktivität der AP fällt bei der ohne Kammern implantierten BMG sehr gering aus.

BMG kleiner 400 µm ohne Kammern, AP in (U/g)
0,10 0,21 0,20 0,48 0,28 1,29 0,15 1,15
Mittelwert: 0,48 ± 0,47

Tab. 5: Aktivität der AP der BMG kleiner 400 µm, welche ohne Kammern implantiert wurde.

Die gemessene Aktivität der AP ist vergleichbar dem in Serie 7 ermittelten Leerwert (0,47 ± 0,26).

5.5 Ergebnisse der Serie 4

Die Serie 4 umfaßt die nach Kollagenaseandauung in Tris-HCl-Puffer in aqua dest. lösliche und unlösliche Fraktion des bei der Andauung verbleibenden Niederschlages.

5.5.1. Lösungsversuch in aqua dest.

Bei dem Lösungsversuch in aqua dest. gehen, wie aus Schema 3 ersichtlich, nur 12,7% in Lösung, die restlichen 87,3% bleiben unlöslich.

5.5.2. Aktivität der AP der löslichen Fraktion

Sechs Proben werden gemessen.

In aqua dest. lösliche Fraktion, AP in U/g
0,44 0,55 0,25 0,22 0,44 0,64
Mittelwert: 0,42 ± 0,16

Tab. 6: Aktivität der AP in U/g (FG) der in aqua dest. löslichen Fraktion des in Kollagenase unlöslichen BMG-Anteiles.

Die Aktivität der AP entspricht dem in Serie 7 ermittelten Leerwert. Dies bedeutet, daß der in aqua dest. löslichen Fraktion keine osteoinduktive Wirkung zukommt.

5.5.3. Aktivität der AP der unlöslichen Fraktion

Es werden acht Proben gemessen.

In aqua dest. unlösliche Fraktion, AP in U/g
2,94 5,34 1,21 1,11 2,61 1,52 4,04 3,41
Mittelwert: 2,77 ± 1,49

Tab. 7: Aktivität der AP in U/g (FG) der in aqua dest. unlöslichen Fraktion des in Kollagenase unlöslichen BMG-Anteiles.

Die Werte weisen gegenüber den bei der löslichen Fraktion ermittelten deutlich auf eine osteoinduktive Wirkung hin.

5.6 Ergebnisse der Serie 5

In Serie 5 werden sechs Implantate mit BMG zwischen 400 µm und 1000 µm in Kammern getestet. Diese BMG-Charge wurde von Fischer 1979 ohne Kammern geprüft und für hochaktiv befunden.

Bei einer eingesetzten Menge von 50 mg pro Implantat erzielte er eine Aktivität der AP von 12,14 ± 2,04 U/g (FG).

Im vorliegenden Versuch werden 20 mg pro Kammer eingesetzt.

BMG zwischen 400 µm und 1000 µm in Kammern, AP in U/g
1,13
2,46
2,89
1,26
3,31
2,67
Mittelwert: 2,29 ± 0,89

Tab. 8: Aktivität der AP in U/g (FG) der in Kammern implantierten BMG zwischen 400 µm und 1000 µm.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse bei Implantation in Kammern mit denen ohne Kammern ist nicht möglich, da im ersten Fall 20 mg BMG, im zweiten Fall 50 mg BMG eingesetzt werden.

Dennoch zeichnet sich ein Verlust an Enzymaktivität bei der Verwendung von Kammern ab.

5.7 Ergebnisse der Serie 6

Bei Serie 6 handelt es sich um die Implantation der in Kollagenase löslichen und unlöslichen Fraktion von BMG zwischen 400 µm und 1000 µm. Die Kollagenase-andauung wurde in Hank's solution-Elektrolytlösung vorgenommen.

5.7.1. Aktivität der AP der in Kollagenase löslichen Fraktion

Von den zwei implantierten Proben á 10 mg wird eine Probe histologisch untersucht, die andere Probe zeigt eine Aktivität der AP von 6,16 U/g (FG).

5.7.2. Aktivität der AP der in Kollagenase unlöslichen Fraktion

Die unlösliche Fraktion weist eine Aktivität der AP von 1,97 U/g (FG) auf. Auch hier wurden 10 mg/Kammer implantiert.

Angesichts der geringen Probenanzahl läßt sich mit diesen beiden Ergebnissen sicherlich kein Beweis antreten. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, daß der die Osteoinduktion bewirkende Faktor in der in Kollagenase löslichen Fraktion mit hoher AP-Aktivität zu suchen ist.

Die zur Andauung verwendete BMG zwischen 400 µm und 1000 µm besitzt ohne Kammern implantiert nach 10 Tagen eine Aktivität von 7,8 U/g (FG) bei Implantation von 50 mg.

5.8 Ergebnisse der Serie 7

In Serie 7 werden zur Leerwertbestimmung leere Kammern vom Typ 2 17 Tage in der Rattenbauchmuskulatur belassen.

Folgende Aktivitäten werden gemessen:

Tab. 9: Aktivität der AP in U/g (FG) gemessen in der die leeren Kammern umgebenden Muskulatur.

leere Kammern, Aktivität der AP in U/g (FG)
0,27
0,40
0,47
1,02
0,43
0,16
0,38
0,63
Mittelwert: 0,47 ± 0,26

5.9 Übersicht über die Serien

Die in den Serien 1 bis 7 errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Enzymaktivität werden in einer Tabelle und einem Schaubild zusammengestellt.

Tab. 10: Übersicht über die Enzymaktivität der AP in U/g (FG) der Serien 1 bis 7.

Angegeben sind, mit Ausnahme von Serie 6, die Mittelwerte mit Standardabweichung. n ist die Anzahl der gemessenen Proben.

Implantate	AP (U/g)
Serie 1: a) in Serum inkubierte demineralisierte Matrix kleiner 400 µm in Kammern, Inkubationszeit:	
a_1): 2 Tage	4,57 ± 1,40 n = 4
a_2): 4 Tage	5,70 ± 3,74 n = 4
a_3): 6 Tage	8,34 ± 3,65 n = 4
a_4): 8 Tage	6,62 ± 3,28 n = 4
b) in Puffer inkubierte demineralisierte Matrix kleiner 400 µm in Kammern, Inkubationszeit:	
b_1): 2 Tage	4,74 ± 0,64 n = 4
b_2): 4 Tage	3,43 ± 0,93 n = 4
b_3): 6 Tage	3,30 ± 2,20 n = 4
b_4): 8 Tage	4,42 ± 3,19 n = 4
Es wurden je Probe 250 mg demineralisierte Matrix eingesetzt.	

Serie 2: Fraktionen, die aus dem Überstand der in Tris-HCl-Puffer mit Kollagenase angedauten BMG gewonnen wurden; 10 mg Implantate in Kammern	
a) Peak I (hochmolekular)	1,19 ± 0,88 n = 3
b) Peak II (niedermolekular)	0,52 ± 0,40 n = 3
Serie 3: BMG kleiner 400 µm; 20 mg Implantate	
a) in Kammern	1,42 ± 0,68 n = 8
b) in Kammern mit Oxalat	2,28 ± 1,61 n = 2
c) ohne Kammern	0,48 ± 0,47 n = 8
Serie 4: bei der Kollagenaseandauung in Tris-HCl-Puffer verbleibender Niederschlag; 20 mg Implantate in Kammern	
a) in aqua dest. löslicher Teil	0,42 ± 0,16 n = 6
b) in aqua dest. unlöslicher Teil	2,77 ± 1,49 n = 8

Serie 5: BMG zwischen 400 µm und 1000 µm; 20 mg Implantate in Kammern	2,29 ± 0,89 n = 6
Serie 6: in Hank's solution-Elektrolytlösung mit Kollagenase angedaute BMG zwischen 400 µm und 1000 µm; 10 mg Implantate in Kammern	
a) in Kollagenase lösliche Fraktion	6,16
b) in Kollagenase unlösliche Fraktion	1.97
Serie 7: leere Kammern	0,47 ± 0,26 n = 8

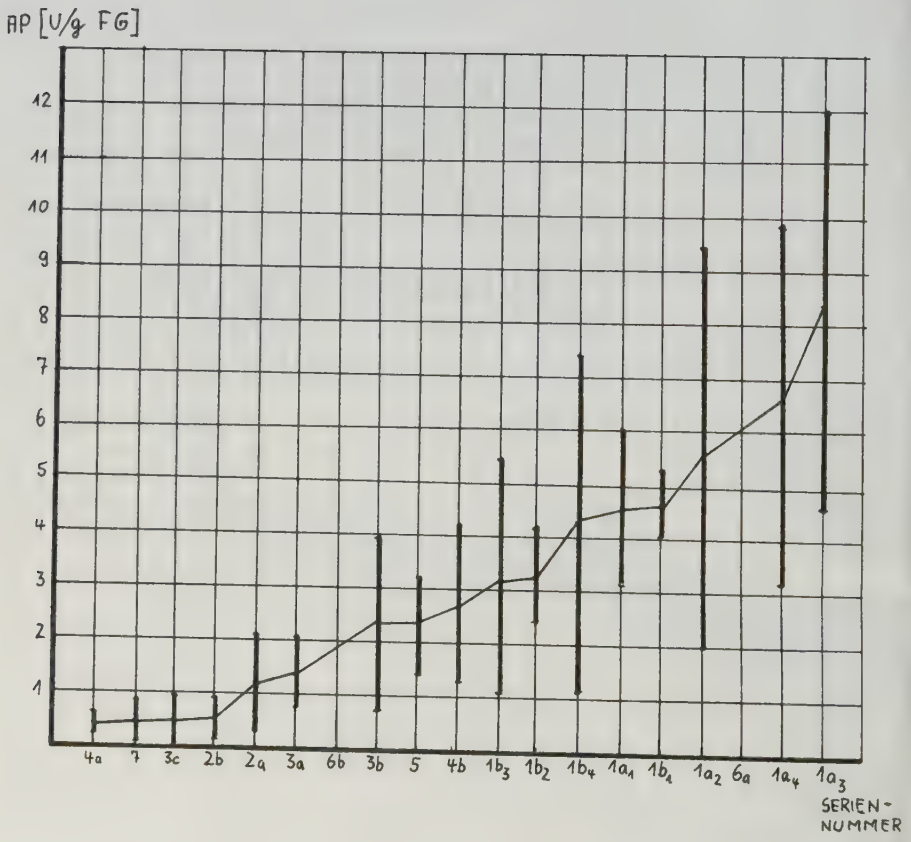


Abb. 19: Aktivität der AP in U/g FG der Serie 1 bis 7 der Größe nach geordnet.

Die Serienbezeichnungen entsprechen denen in Tab. 10.

5.10 Ergebnisse der histologischen Untersuchung

Alle hier geschilderten Beobachtungen werden 28 Tage nach Implantation angestellt.

Leer implantierte Kammern werden von Bindegewebe eingehüllt. Diese Abkapselung von der Umgebung ist Ausdruck einer Fremdkörperreaktion. Lymphogranulozytäre Infiltrate im Sinne einer chronischen Entzündung liegen nicht vor.

In Kammern implantierte Knochengelatine der Partikelgröße kleiner 400 µm zeigt eine dem Leerwert ähnliche bindegewebige Umhüllung.

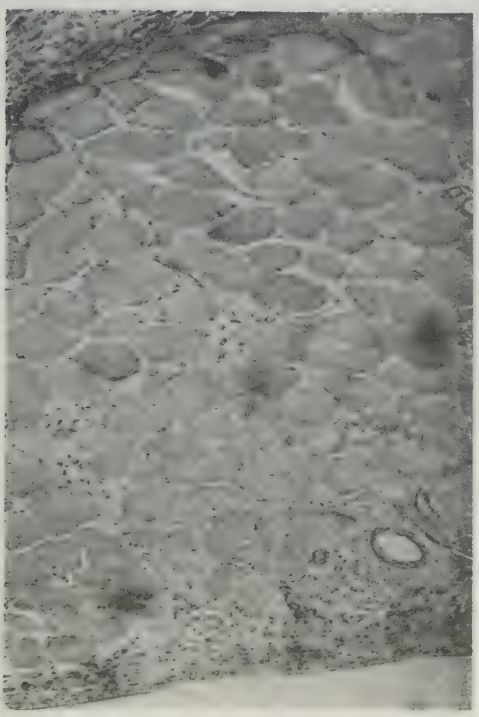


Abb.20: Leere Kammer nach 28 Tagen. An der Außenseite der am unteren Bildrand erkennbaren Kammermembran (1) ist das neugebildete, von Gefäßen (2) durchzogene Bindegewebe zu sehen.
Nach oben schließt sich die umgebende Muskulatur an (Färbung: Masson-Goldner).

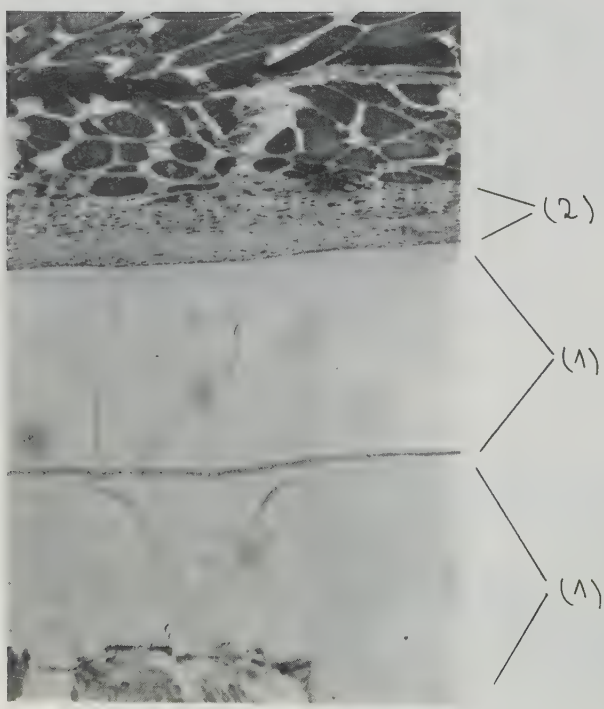


Abb. 21: BMG kleiner 400 µm in Kammern implantiert nach 28 Tagen. Im Anschluß an die zwei Kammermembranen (1) ist im obersten Bilddrittel das neugebildete Bindegewebe (2) deutlich erkennbar (Färbung: Masson-Goldner).

Die histologische Untersuchung des Präparates, bei dem in Hank's solution-Elektrolytlösung kollagenaselösliche BMG zwischen 400 µm und 1000 µm in einer Kammer implantiert wurde, weist 28 Tage nach Implantation färberisch keine Bindegewebs- bzw. Kollagenfaserneubildung auf.

Stattdessen befinden sich vor allem in Membrannähe riesige Zellen mit großem Kern und teils klarem, teils eosinophilem Zytoplasma. Diese Zellen können als Osteoprogenitorzellen angesehen werden.

Außerdem wird das Präparat von einer dichten Schicht von Fibrozyten umgeben. Die vereinzelt auftauchenden Lymphozyten nehmen zur Membran hin an Häufigkeit zu. Das die Kammer umgebende Gewebe ist gut vaskularisiert.

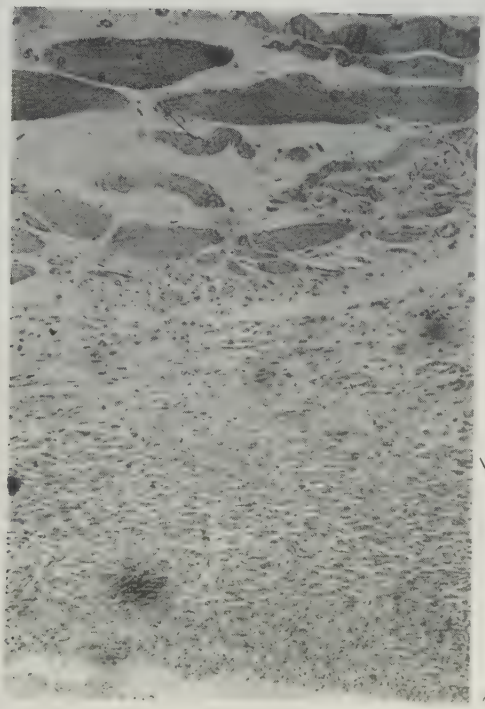


Abb. 22: In Hank's solution-Elektrolytlösung kollagenaselösliche BMG zwischen 400 µm und 1000 µm 28 Tage nach Implantation in einer Kammer. In der unteren Bildhälfte tritt die die Kammer umgebende dichte Fibrozytenschicht (1) deutlich hervor (Färbung: Masson-Goldner).

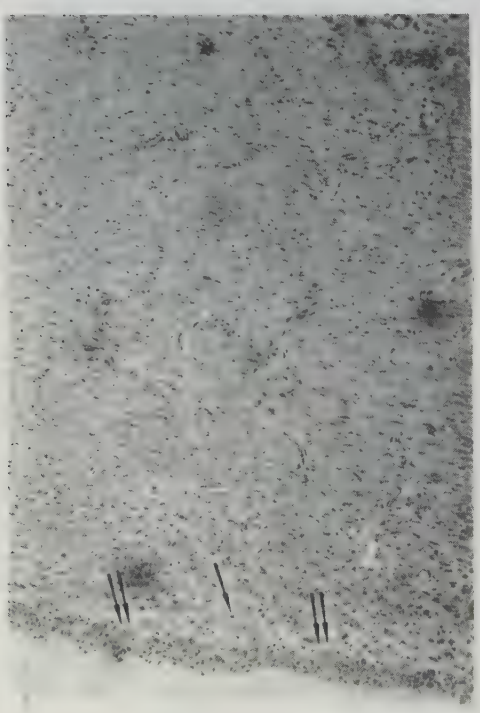


Abb. 23: Präparat von Abb. 21 bei weiterer Vergrößerung der die Kammer unmittelbar umgebenden Gewebsschicht. Große Zellen (Osteoprogenitorzellen), Lymphozyten und Kapillaren sind zu beobachten (Färbung: Masson-Goldner).

6. Diskussion

Der Gewichtsverlauf bei der Herstellung der Knochengelatine differiert von dem in der Literatur beschriebenen (Urist et al., 1973; Urist et al., 1974 (b)) nur wenig.

Der Gewichtsverlust bei der Demineralisierung des Knochens beträgt 85,7 % gegenüber ca. 79 % in der Literatur. Ein direkter Vergleich der beiden Angaben ist jedoch nicht möglich, da sich die eigenen Angaben auf Feuchtgewicht, der in der Literatur beschriebene Prozentsatz jedoch auf Trockengewicht bezieht.

Der bei der Überführung von demineralisierter Matrix in Knochengelatine entstehende Verlust beträgt in der eigenen Arbeit 13 % mehr als in der Literatur beschrieben (Urist et al., 1973). Für diese Differenz können drei verschiedene Faktoren verantwortlich sein:

Erstens differierte die Versuchstemperatur um 2°C nach oben in der eigenen Arbeit, zweitens könnte das kräftige Rühren während der Extraktionsschritte diese effizienter gemacht haben, und drittens ist der Verlust von kleinen Knochenmengen beim Lösungsmittelwechsel nie ganz auszuschließen.

Bei der Kollagenaseandauung von BMG kleiner 400 µm ergeben sich je nach verwendetem Medium sehr unterschiedliche Ergebnisse. Während bei der in Tris-HCl-Puffer erfolgten Andauung nur 30 % (TG) in Lösung gehen, lösen sich unter Einsatz von Hank's solution-Elektrolytlösung 98,5 % (TG).

Offensichtlich bietet Hank's solution-Elektrolytlösung optimale Bedingungen bei der Kollagenaseandauung von BMG.

Auch die größeren Gelatinepartikel zwischen 400 µm und 1000 µm werden zu 95,1 % (TG) in Hank's solution-Elektrolytlösung gelöst. Die Differenz der Löslichkeit in Abhängigkeit von der Partikelgröße kann leicht durch die bei den größeren Partikeln für die Kollagenase kleinere Angriffsfläche erklärt werden.

Bei der Implantation leerer Kammern zur Leerwertbestimmung ergibt sich eine Aktivität der AP von 0,47 ± 0,26 U/g.

Diese Aktivität liegt höher als die Aktivität der Bauchmuskulatur einer Ratte, welche keinerlei Manipulation unterzogen wird. Späth (1979) gibt eine Aktivität in der Bauchmuskulatur von 0,18 ± 0,06 U/g an, Fischer (1979) einen Wert von 0,13 ± 0,03 U/g. Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Leerwert muß als Entzündungs- oder Fremdkörperreaktion gewertet werden, da Leukozyten und Riesenzellen alkalische Phosphatase enthalten.

Die in Serum inkubierte demineralisierte Matrix zeigt in Kammern implantiert eine Aktivität von 6,31 ± 3,17 U/g, wenn man den Mittelwert aus allen in Serum inkubierten Proben betrachtet. Dieser Wert liegt bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von a = 0,05 signifikant über dem bei der Inkubation in Puffer errechneten Mittelwert von 3,97 ± 1,91 U/g.

Aber auch innerhalb der Gruppe der in Serum inkubierten Proben ergeben sich in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer Unterschiede. Die Aktivität der AP steigt kontinuierlich an und erreicht einen Höhepunkt bei den sechs Tage lang inkubierten Proben. Nach acht Tagen Inkubation fällt sie wieder ab. Die Enzymaktivität der in Puffer inkubierten Proben zeigt hingegen kaum eine Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Das Inkubationsmedium ist also für die osteoinduktive Wirkung zusätzlich zur Dauer der Einwirkung, zum pH-Wert und zur Temperatur von Bedeutung.

Bei neutralem pH beobachten Urist und seine Mitarbeiter (Urist et al., 1974 (b)) einen raschen zeit- und temperaturabhängigen Rückgang der Osteogeninaktivität. Dieser beträgt 100 % bei einem pH-Wert von 7,4 und 37 ^{o} C innerhalb von 12 Stunden. In sauren Pufferlösungen bleibt die Aktivität größtenteils erhalten.

Für die Aktivitätseinbuße wird eine BMPase verantwortlich gemacht, deren pH-Optimum im neutralen Bereich liegt (Urist et al., 1972; Urist et al., 1973).

Die BMPase wird jedoch durch Chloroform/Methanol und durch Lithiumchlorid extrahiert oder zerstört (Urist et al., 1973). Vor dem Entkalken des Knochens wird dieser in Chloroform/Methanol entfettet. Die postulierte BMPase müßte folglich zerstört oder extrahiert worden sein.

Trotzdem ergibt sich sowohl in der Literatur (Urist et al., 1977 (a)) als auch in der eigenen Arbeit eine Abhängigkeit der osteoinduktiven Wirkung von der Inkubationsdauer der Proben in Serum bzw. Puffer. Bestandteile des Serums könnten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit Inhibitoren des BMP abschwächen und somit die osteoinduktive Wirkung steigern.

Die Frage nach der Art der Inhibitoren und nach der Beschaffenheit ihrer Gegenspieler bleibt offen.

Urist und seine Mitarbeiter behaupten, daß in allogenem Serum oder Puffer inkubierte Knochengelatine in Abhängigkeit von der Inkubationszeit neuen Knochen bildet und rekalzifiziert (Urist et al., 1977 a)). Demineralisierter und autodigestierter Knochenmatrix, welche nicht in BMG umgewandelt wurde, sprechen sie jedoch bei Implantation sowohl Knochenneubildung als auch Rekalzifizierung ab.

Diese Behauptung steht im Gegensatz zu den vorliegenden Untersuchungen, in denen die Implantate demineralisierter, autodigestierter Matrix eine hohe Enzymaktivität zeigen. Zusätzlich weisen die Röntgenbilder auf eine Rekalzifizierung bei den in Serum inkubierten Proben hin.

Die Abhängigkeit von der Inkubationszeit stellt sich bei Urist und seinen Mitarbeitern zum Teil anders dar als in der vorliegenden Arbeit. In der Literatur ist die Knochenneubildung bei den ein bzw. vier Tage inkubierten Proben gleich hoch, während sie bei den zwei bzw. drei Tage inkubierten Proben geringer ausfällt. Die Frage nach dem Verlauf bei längerer Inkubationsdauer bleibt unbeantwortet.

In der vorliegenden Arbeit wird hingegen, wie bereits erwähnt, ein Aktivitätsmaximum nach sechs Tagen Inkubation in Serum sichtbar, dem ein Aktivitätsanstieg von zwei zu vier Tagen Inkubationsdauer, wie in der Literatur beschrieben, vorausgeht.

Es ergibt sich jedoch ein von diesem abweichender Verlauf der Enzymaktivität bei den in Puffer inkubierten Proben. Hier tritt eine Abhängigkeit von der Inkubationsdauer nicht in dem Maße in Erscheinung. Es ist jedoch eine Aktivitätseinbuße der vier Tage gegenüber den zwei Tage inkubierten Proben zu verzeichnen.

Die säulenchromatographische Auftrennung der in Tris-HCl-Puffer mit Kollagenase angedauten BMG zeigt zwei Peaks. Diese entsprechen sich sowohl bei der Aufzeichnung im 276 nm-Bereich als auch bei der im 254 nm-Bereich. Es ergeben sich hiermit die in der Literatur bei 280 nm gemessene hochmolekulare und niedermolekulare Fraktion. Eine dritte Fraktion mit mittlerem Molekulargewicht, wie sie Urist und seine Mitarbeiter in ihrer Analyse erhalten (Urist et al., 1977 a)), taucht in der vorliegenden Auftrennung nicht auf.

Die Testung der Fraktionen ergibt eine höhere Aktivität der AP für den hochmolekularen Peak I im Vergleich zum niedermolekularen Peak II. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Dagegen besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Aktivität von Peak I und dem durch Implantation von leeren Kammern ermittelten Leerwert bei einem Signifikanzniveau von a = 0,1.

Peak II unterscheidet sich nicht signifikant vom Leerwert.

Dies Ergebnis kommt dem in der Literatur beschriebenen nahe. Urist und seine Mitarbeiter messen ebenfalls der hochmolekularen Fraktion I die größere Bedeutung bei der Knochenbildung zu (Urist et al., 1977 a)).

Ein Vergleich der AP-Aktivität zwischen der in aqua dest. löslichen Fraktion des Niederschlages, der bei der Kollagenaseandauung von BMG kleiner 400 µm in Tris-HCl-Puffer entstand, und der in aqua dest. unlöslichen Fraktion ergibt einen signifikanten Unterschied. Dem in aqua dest. in Lösung gegangenen Anteil kommt verglichen mit dem Leerwert keine osteogene Aktivität zu (0,42 ± 0,16 U/g; Leerwert: 0,47 ± 0,26 U/g). Dagegen zeigt der in aqua dest. unslösliche Anteil eine Aktivität von 2,77 ± 1,49 U/g.

Die Kollagenaseandauung in Hank's solution-Elektrolytlösung steigert im Verhältnis zu der Andauung in Tris-HCl-Puffer nicht nur den Prozentsatz der durch Kollagenase abgedauten BMG, wie bereits erwähnt, sondern wahrscheinlich auch die Aktivität der abgedauten Knochengelatine:

Bei der Kollagenaseandauung in Tris-HCl-Puffer zeigt die in Kollagenase lösliche Fraktion im besten Fall (Peak I) eine Aktivität der AP von 1,19 ± 0,88 U/g. In Hank's solution-Elektrolytlösung kollagenaselösliche BMG weist eine Aktivität von 6,16 U/g auf. In beiden Fällen werden 10 mg pro Kammer implantiert, jedoch handelt es sich bei der Andauung in Tris-HCl-Puffer um BMG kleiner 400 µm, bei der Andauung in Hank's solution-Elektrolytlösung um BMG zwischen 400 µm und 1000 µm. Die Partikelgröße zwischen 400 µm und 1000 µm spielt, wie wir noch sehen werden, zu Gunsten einer Aktivitätssteigerung eine Rolle. Sie allein kann jedoch niemals für die hohe Aktivität verantwortlich sein.

Die einmalig erzielte Aktivität von 6,16 U/g übersteigt die Aktivität von Peak I um ca. das 5-Fache. Da hier aber nur eine einzige Probe untersucht werden konnte, soll dieses Ergebnis nicht überbewertet werden.

Festzuhalten bleibt, daß möglicherweise durch die Kollagenaseandauung in Hank's solution-Elektrolytlösung ein hoher Prozentsatz an Knochengelatine in Lösung gebracht werden kann, welcher über eine hohe osteogenetische Aktivität verfügt.

Selbst die in Kollagenase unlösliche Probe weist noch eine Aktivität von 1,97 U/g auf und liegt somit immer noch über der Aktivität der bei der chromatographischen Auftrennung gewonnenen Fraktion I (1,19 ± 0,88).

Die Aktivität der AP beträgt bei der in Kammern implantierten BMG mit Durchmesser kleiner 400 µm 1,42 ± 0,68 U/g. Gibt man zusätzlich Oxalat in die Kammern so ergibt sich eine Aktivität von 2,28 ± 1,61 U/g.

Auf den ersten Blick mag dies als leichte Steigerung der Aktivität erscheinen. Die Untersuchungen mit dem t-Test ergeben jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen bei Implantation reiner BMG verglichen mit denen bei Implantation von BMG mit Oxalat. Das Oxalat wirkt sich also auf keinen Fall nachteilig auf die Knochenneubildung aus.

BMG kleiner 400 µm ohne Kammern implantiert ergibt eine Aktivität von 0,48 ± 0,47 U/g, welche dem Leerwert gleichkommt. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der in Kammern und der ohne Kammern implantierten BMG kleiner 400 µm. Die Werte sind direkt miteinander vergleichbar, da jeweils 20 mg Implantate eingesetzt wurden.

Zwei Ursachen kommen für den Verlust der Aktivität bei Implantation ohne Kammern in Frage:

Zum einen können aus den kleinen Partikeln kleiner 400 µm sehr rasch, auch schneller als aus großen Partikeln, Bestandteile in Lösung gehen (Urist et al., 1977 b)). Dies könnte natürlich auch für das Osteogenin zutreffen, das wegdiffundiert und seine Aktivität am Implantationsort verliert.

Zum anderen können die kleinen BMG-Partikel phagozytiert, und ihre osteogenetische Wirkung damit zerstört werden (Reddi and Huggins, 1973; Nogami and Urist, 1975).

Die Knochengelatine mit der Partikelgröße zwischen 400 µm und 1000 µm zeigt in Kammern implantiert eine Enzymaktivität von 2,29 ± 0,89 U/g bei Verwendung von 20 mg Implantaten.

Dieselbe Knochengelatine weist bei Testung von 50 mg Implantaten ohne Kammern eine Aktivität von 12,14 ± 2,04 U/g auf (Fischer, 1979).

Es ist anzunehmen, daß nicht allein die Implantatmenge sondern auch der Einsatz der Kammern zu der starken Reduktion der Enzymaktivität auf ca. ein Fünftel führen.

Die Bedeutung der Implantatmenge für die erzielbare Enzymaktivität wurde bereits untersucht (Fischer, 1979). Dabei wurde festgestellt, daß bei Einsatz von 100 mg Implantaten gegenüber 50 mg Implantaten eine um das 2,6-Fache höhere Aktivität der AP gemessen werden kann.

Durch die Verwendung der Diffusionskammern wird der Einfluß von Matrixvesikeln, einwachsenden Blutgefäßen und anderen zellvermittelten Mechanismen auf die Knochenneubildung ausgeschlossen (Urist et al., 1977 b)). Der Ausfall dieser Einflußgrößen kann für eine Reduktion der Knochenbildung verantwortlich gemacht werden.

Gegenüber der Enzymaktivität der in Kammern implantierten BMG kleiner 400 µm von 1,42 ± 0,68 U/g liegt die Aktivität der in Kammern implantierten BMG zwischen 400 µm und 1000 µm etwa um den Faktor 1,6 höher. Die größeren Partikel induzieren also eine höhere Enzymaktivität. Die Partikelgröße spielt somit nicht nur bei der Implantation ohne Kammern (Urist et al., 1975 b)), sondern auch bei der Verwendung von Kammern eine Rolle. Die erwähnten Ergebnisse sind direkt miteinander vergleichbar, da die gleiche Implantatmenge verwendet wurde (20 mg pro Kammer).

Die Histologie der in Hank's solution-Elektrolytlösung kollagenaselöslichen BMG zeigt Osteoprogenitorzellen an der Außenseite der Kammermembran. Dieser Befund stützt die mit derselben BMG einmalig erzielte Enzymaktivität von 6,16 U/g.

Bei der Untersuchung eines Präparates, bei dem BMG kleiner 400 µm in Kammern implantiert wurde, findet man hingegen nur eine dem Leerwert analoge Bindegewebsneubildung in Kammernähe. Dies zeigt einmal mehr, daß, wie Firschein und Urist 1972 feststellten, die Aktivität der alkalischen Phosphatase den frühesten Hinweis für die Differenzierung von Osteoblasten liefert.

7. Zusammenfassung

Demineralisierte und autodigestierte Knochenmatrix ist osteogenetisch aktiv. Eine Steigerung der osteoinduktiven Wirkung ist in Abhängigkeit von der Beschaffenheit des zur Autodigestion verwendeten Mediums und von der Inkubationsdauer möglich.

Eine maximale Aktivität wird durch 6-tägige Inkubation in allogenem Serum erzielt.

Bei der säulenchromatographischen Auftrennung einer durch Kollagenase in Tris-HCl-Puffer angedauten Knochengelatine ergeben sich zwei Fraktionen. Die hochmolekulare Fraktion ist osteogenetisch wirksam, die niedermolekulare Fraktion erweist sich als inaktiv.

Die Kollagenaseandauung in Hank's solution-Elektrolytlösung erweist sich gegenüber der in Tris-HCl-Puffer als vorteilhaft. Bei der Andauung in Hank's solution-Elektrolytlösung gehen 98,5 % (TG) der eingesetzten BMG in Lösung, bei der Andauung in Tris-HCl-Puffer werden nur 30 % (TG) der BMG gelöst. Möglicherweise besitzt die in Hank's solution-Elektrolytlösung angedaute Knochengelatine sogar eine höhere osteoinduktive Wirkung als die in Tris-HCl-Puffer behandelte.

Bei Implantation von BMG-Partikeln kleiner 400 µm in Diffusionskammern ist eine Enzymaktivität zu verzeichnen, die signifikant über der bei Implantation ohne Kammern liegt.

Bei Implantation ohne Kammern ist keine osteoinduktive Wirkung erkennbar, wofür die Partikelgröße und zellvermittelte Mechanismen gemeinsam verantwortlich sein können.

Die Testung von Knochengelatine mit der Partikelgröße zwischen 400 µm und 1000 µm in Kammern ergibt eine geringere Enzymaktivität als die Testung von Knochengelatine derselben Partikelgröße ohne Kammern.

Die Partikelgröße spielt sowohl bei Implantation ohne als auch in Kammern eine Rolle. Bei Implantation in Kammern liegt die ermittelte Aktivität der AP bei den großen Partikeln zwischen 400 µm und 1000 µm 1,6 mal höher als bei den Partikeln kleiner 400 µm.

8. Literaturverzeichnis

1. Amitani, K.: Bone induction experiment. II. Histochemical observation of transfilter bone induction.
J. Japan. Orthop. Ass. (Tokyo) 47, 1250 - 1252 (1973)

2. Amitani, K. and Y. Nakata: Studies on a factor responsible for new bone formation from osteosarcoma in mice.
Calcif.Tiss. Res. 17, 139 - 150 (1975)

3. Amitani, K., Y. Nakata and J. Stevens: Bone induction by lyophilized osteosarcoma in mice.
Calcif.Tissue Res. 16, 305 - 313 (1974)

4. Annersten, S.: Bone regeneration by hormone induction.
Nord. Kir. Forenings Förhandlingar, Oslo (1939)

5. Annersten, S.: Experimentelle Untersuchungen über die Osteogenese und die Biochemie des Frakturkallus.
Acta Chir. Scand. 84, Suppl. 60, 1 - 181 (1940)

6. Axhausen, G.: Histologische Untersuchungen über Knochentransplantation am Menschen.
Dtsch. Z. Chir. 91, 388 - 428 (1907)

7. Baikow, A.: Über Transplantation von Knochenmark.
Zentralbl. Med. Wiss. 8, 371 - 373 (1870)

8. Barth, A.; Über histologische Befunde nach Knochenimplantationen.
Arch. klin. Chir. 46, 409 - 417 (1893)

9. Basset, C.A.L.: Environmental and cellular factors regulating osteogenesis.
In: Frost, H. (ed.): Bone biodynamics.
Boston, Little (1964)

10. Becker, R.O.: The bioelectric factors in amphibian limb regeneration.
J. Bone Jt. Surg. 43-A, 643 - 656 (1961)

11. Becker, R.O.: Electrical osteogenesis - pro and con.
Calcif. Tissue Res. 26, 93 - 97 (1978)

12. Bélanger, L.F., J. Robichon and M.R. Urist: The effects of magnesium deficiency on the host response to intramuscular bone matrix implanted in the rat.
J. Bone Jt. Surg. 57-A, Nr. 4,522 - 526 (1975)

13. Bertelsen, A.: Experimental investigations into post- foetal osteogenesis.
Acta Orthop. Scand. 15, 139 - 181 (1944)

14. Bessey, O.A., O.H. Lowry and M.J. Brock: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum.
J. Biol. Chem. 164, 321 - 329 (1946)

15. Boellaard, J.W. und T. Hirsch: Die Herstellung histologischer Schnitte von nicht entkalktem Knochen mittels Einbettung in Methacrylsäureester.
Mikroskopie 13, 386 - 391 (1959)

16. Brighton, C.T., S. Adler, J. Black, N. Itada and Z.B. Friedenberg: Cathodic oxygen consumption and electrically induced osteogenesis.
Clin. Orthop. 107, 277 - 282 (1975)

17. Bruns, P.: Über Transplantation von Knochenmark.
Arch. klin. Chir. 26, 661 - 668 (1881)

18. Buring, K. and M.R. Urist: Effects of ionizing radiation of the bone induction principle in matrix of bone implants.
Clin. Orthop. 55, 225 - 234 (1967)

19. Chalmers, J.: Transplantation immunity in bone homografting.
J. Bone Jt. Surg. 41-B, 160 - 179 (1959)

20. Cooke, P.A. and W.J. Price: Analysis with the SP 90 atomic absorption spectrophotometer. The determination of metals in clinical and biological samples.
Unicam Spectrovision 16, 7 - 11 (1966)

21. Davis, J.S. and J.A. Hunnicutt: The osteogenic power of periosteum: With a note on bone transplantation. An experimental study.
Ann. Surg. 61, 672 - 685 (1915)

22. Deaver, J.B.: Secondary bone implantation by a modification of Senn's method.
Med. News 55, 714 (1889)

23. Duhamel, H.L.: Mémoires de l'Academie des Sciences.
Acta Chir. Scand. 74, Suppl. 31 (1934)

24. Elves, M.W. and R. Salama: A study of the development of cytotoxic antibodies produced in recipients of xenografts of iliac bone.
J. Bone Jt. Surg. 56-B, 331 - 339 (1974)

25. Fasol, P. und P. Galle: Spätergebnisse nach Implantation heterologen Knochenmaterials.
Chir. Praxis 17, 587 - 591 (1973)

26. Firschein, H.E. and M.R. Urist: The induction of alkaline phosphatase by extraskeletal implants of bone matrix.
Calcif. Tiss. Res. 7, 108 - 113 (1971)

27. Firschein, H.E. and M.R. Urist: Enzyme induction, accumulation of collagen and calcification in implants of bone matrix.
Clin. Orthop. 84, 263 - 274 (1972)

28. Fischer, H.P.: Untersuchungen zur osteoinduktiven Wirkung von Knochengelatine.
Doktorarbeit, Tübingen (1979)

29. Friedebold, G., A.N. Witt, L. Hanslik und A. Jendryschik: Kritische Untersuchungen über den klinischen Wert homoio- und heteroplastischer Knochenspantransplantationen.
Arch. Orthop. Trauma. Surg. 55, 627 - 671 (1963)

30. Friedenstein, A.J.: Humoral nature of osteogenic activity of transitional epithelium. Nature 184, 698 - 699 (1962)

31. Glucksmann, A.: The role of mechanical stresses in bone formation in vitro. J. Anat. 76, 231 - 239 (1942)

32. Goldhaber, P.: Osteogenic induction across millipore filters in vivo. Science 133, 2065 - 2067 (1961)

33. Goujon, E.: Recherches expérimentales sur les propriétés physiologiques de la moelle des os. J. de l'Anat. et de la Physiolog. 6, 399 - 412 (1869)

34. Haller, A.v.: Experimenta de ossium formatione. Opera minora, Lausanne (1763)

35. Ham, A. and S. Gordon: The origin of bone that forms in association with cancellous chips transplanted into muscle. Br. J. Plast. Surg. 5, 154 - 160 (1952)

36. Ham. A.W. and W.R. Harris: Repair and transplantation of bone. In: Bourne, G.H.: The biochemistry and physiologie of bone. III Academic Press, Inc., New York, 337 - 399 (1971)

37. Hancox, N.M. and K. Wlodarski: The role of host site in bone induction by transplanted xenogenic epithelial cells. Calcif. Tiss. Res. 8, 258 - 261, (1972)

38. Hartley, J. and S.S. Tanz: Experimental osteogenesis in rabbit muscle. Arch. Surg. 63, 845 - 851 (1951)

39. Heinen, J.H., G.H. Dabbs and H.A.Mason: The experimental production of ectopic cartilage and bone in the muscle of rabbits. J. Bone Jt. Surg. 31-A, 765 - 775 (1949)

40. Heiple, K.G., C.H. Herndon, S.W. Chase and A. Wattleworth: Osteogenic induction by osteosarcoma and normal bone in mice.
J. Bone Jt. Surg. 50-A, 311 - 325 (1968)

41. Heslop, B.F., I.M. Zeiss and N.W. Nisbet: Studies on the transference of bone. I. A comparison of autologous and homologous bone implants with the reference to osteocyte survival, osteogenesis and host reaction.
Br. J. Exp. Pathol. 41, 269 - 287 (1960)

42. Huggins, C.B.: The formation of bone under the influence of epithelium of the urinary tract.
Arch. Surg. 22, 377 - 408 (1931)

43. Huggins, C.B. and J.F. Sammet: Function of the gall bladder epithelium as an osteogenic stimulus and the physiological differentiation of connective tissue.
J. Exp. Med. 58, 393 - 400 (1933)

44. Huggins, C.B., H.R. Mc Caroll and B.H. Blocksom: Experiments on the theory of osteogenesis.
Arch. Surg. 32, 915 - 931 (1936)

45. Huggins, C.B., S. Wiseman and A.H. Reddi: Transformation of fibroblasts by allogeneic and xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone.
J. Exp. Med. 132, 1250 - 1258 (1970)

46. Iwata, H. and M.R. Urist: Protein polysaccharide of bone morphogenetic matrix.
Clin. Orthop. 87, 257 - 274 (1972)

47. Lacroix, P.: Recent investigations on the growth of bone.
Nature 156, 576 (1945)

48. Lacroix, P.: Organizers and the growth of bone.
J. Bone Jt. Surg. 29, 292 - 296 (1947)

49. (a) Leaver, A.G., J.T. Triffitt and J.B. Holbrook: Newer knowledge of noncollagenous protein in dentin and cortical bone matrix.
Clin. Orthop. 110, 269 - 292 (1975)

50. (b) Leaver, A.G., J.B. Holbrook, J.L. Jones, M.T. Sheil and L. Sheil: Components of the organic matrices of bone and dentin isolated only after digestion with collagenase.
Arch. Oral Biol. 20, 211 - 216 (1975)

51. Leriche, R. et A. Policard: Les problémes de la physiologie normale et pathologique de l'os.
Paris, Masson (1926)

52. Levander, G.: A study of bone regeneration.
Surg. Gynecol. Obstet. 67, 705 - 714 (1938)

53. Levander, G. and H. Willestaedt: Alcohol- soluble osteogenetic substance from bone marrow.
Nature 157, 587 (1946)

54. Lowry, C.H., N.J. Rosegrough, A.L. Farr and R.J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

55. Mackie, W.: Clinical observations on the healing of aseptic bone cavities by Senn's method of implantation of antiseptic decalcified bone.
Med. News 57,202 (1890)

56. Mandl, I. H. Zipper and L.T. Ferguson: Clostridium histolyticum Collagenase: Its Purification and Properties.
Arch. Biochem. Biophys. 74, 465 - 475 (1958)

57. Martin, L.F., y R.M. Zarapico: Obtension experimental de hueso metaplasico.
Trab., Inst. Nac. Cien. Med. 6, 1973 - 215 (1946)

58. Miller, A.G.: A case of bone grafting with decalcified bone chips.
Remarks, Lancet 2, 618 (1890)

59. Morison, A.E.: Bone graft surgery.
Br. Med. J. 1, 190 (1923)

60. Mosiman, R.S.: Discussion to: Osteogenetic potency and new - bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye.
J. Bone Jt. Surg. 34-A, 470 - 476 (1952)

61. Neuhof, H.: Fascia transplantation into visceral defects: An experimental and clinical study.
Surg. Gynecol. Obstet. 24, 383 - 427 (1917)

62. Nogami, H. and M.R. Urist: Transmembrane bone matrix gelatine- induced differentiation of bone.
Calcif. Tiss. Res. 19, 153 - 163 (1975)

63. Oldroyd, D.D. and G.M. Herring: A method for the study of bone mucosubstances using collagenase.
Biochem. J. 104, 20 (1967)

64. Pfeiffer, C.A.: Effects of bone extract injected into the mouse testis.
Conference on metabolic aspects of convalescence, seventeenth meeting, 175 - 187 pp.
New York, Josiah Macy Jr. Foundation 61948)

65. Price, W.J.: Analytical atomic absorption spectrometry.
2nd ed. Bristol: 1974

66. Putte, K.A. van de, and M.R. Urist: Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix.
Clin. Orthop. 43, 257 - 270 (1965)

67. Ray, R.D. and T.Y. Sabet: Bone grafts: Cellular survival versus induction.
J. Bone Jt. Surg. 45-A, 337 - 344 (1963)

68. Ray, R.D. and A.A. jr. Ward: A preliminary report on studies of basic calcium phosphate in bone replacement.
In: Surgical Forum, American College of Surgeons, 429 - 434
Philadelphia, W.B. Saunders Co. 1952

69. Ray, R.D., J. Degge, P. Gloyd and G. Mooney: Bone regeneration. J. Bone Jt. Surg. 34-A, 638 - 647 (1952)

70. Reddi, A.H.: Collagen and cell differentiation. In: Biochemistry of collagen (Ramachandran, G.N. and A.H. Reddi, eds) New York/London: Plenum Publishing Corp. 1976, pp 449 - 478

71. Reddi, A.H. and C.B. Huggins: Influence of geometry of transplanted tooth and bone on transformation of fibroblasts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143, 634 - 637 (1973)

72. Reddi, A.H. and W.A. Anderson: Collagenous bone matrix induced endochondral ossification and hemopoiesis. J. Cell Biol. 69, 557 - 572 (1976)

73. Romeis, B.: Mikroskopische Technik. München/Wien, 1968 (16. Auflage)

74. Schmidt-Neuerburg, K.P. und C.D. Wilde: Defektüberbrückung an den langen Röhrenknochen. Hefte Unfallheilkd. 113, 1 - 112 (1973)

75. Schüssler, H.: Über die chromatographische Auftrennung sowie Aktivierung und Inaktivierung der alkalischen Phosphatase aus Hühnerdarm. Biochim. Biophys. Acta 151, 383 - 393 (1968)

76. Schulze, W.: Histologische und experimentelle Untersuchungen zur Frage der metaplastischen Knochenbildung. Dtsch. Z. Chir. 217, 33 - 59 (1929)

77. Sharrard, W.J.W. and D.H.Collins: The fate of human decalcified bone grafts. Proc. Roy. Soc. Med. 54, 1101 (1961)

78. Spadaro, J.A.: Electrically stimulated bone growth in animals and man. Clin. Orthop. 122, 325 - 332 (1977)

79. Späth, G.: Vergleich der osteoinduktiven Wirkung allogener und xenogener Knochenmatrix-implantate. Doktorarbeit, Tübingen 1979

80. Tuli, S.M., and R.H. Chaudhuri: Effect of preimplantation treatment on the bone-forming potential of decalcified allogeneic and xenogeneic bone-matrix implants.
Arch. Orthop. Trauma. Surg. 94, 167 - 173 (1979)

81. Upton, L.G.: Bone induction studies using an improved diffusion chamber.
J. Oral Surg. 30, 486 - 490 (1972)

82. Urist, M.R.: Bone formation by autoinduction.
Science 150, 893 - 899 (1965)

83. Urist, M.R.: The substratum for bone morphogenesis.
Dev. Biol. 4, 125 - 163 (1970)

84. Urist, M.R.: Enzymes in bone morphogenesis: Endogenous enzymic degradation of the morphogenetic property in bone in solutions buffered by ethylene diamintetraacetic acid (EDTA)
Ciba Symp. 11, (new series), 143 - 160 (1973)

85. Urist, M.R. and T.A. Dowell: The inductive substratum for osteogenesis in pellets of particulate bone matrix.
Clin. Orthop. 61, 61 - 78 (1968)

86. Urist, M.R. and A. Hernandez: Excitation transfer in bone.
Arch. Surg. 109, 486 - 493 (1974)

87. Urist, M.R. and H. Iwata: Preservation and biodegradation of the morphogenetic property in bone matrix.
J. Theor. Biol. 38, 155 - 167 (1973)

88. Urist, M.R. and F.C. Mc Lean: Osteogenetic potency and new- bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye.
J. Bone Jt. Surg. 34-A, 443 - 468 (1952)

89. Urist, M.R. and B.S. Strates: Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix.
Clin. Orthop. 71, 271 - 278 (1970)

90. Urist, M.R. and B.S. Strates: Bone morphogenetic protein.
J. Dent. Res. 50, 1392 - 1406 (1971)

91. Urist, M.R., H. Iwata and B.S. Strates: Bone morphogenetic protein and proteinase in the guinea-pig.
Clin. Orthop. 85, 275 - 290 (1972)

92. Urist, M.R., A.J. Mikulski and C.N. Conteas:
(a) Reversible extinction of the morphogen in bone matrix by reduction and oxydation of disulfide bonds.
Calcif. Tiss. Res. 19, 73 - 83 (1975)

93. Urist, M.R., A. Mikulski and S.D. Boyd:
(b) A chemosterilized antigen- extracted autodigested alloimplant for bone banks.
Arch. Surg. 110, 416 - 428 (1975)

94. Urist, M.R., A. Mikulski and A. Lietze:
Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 1828 - 1832 (1979)

95. Urist, M.R., H. Nogami and A. Mikulski:
A bone morphogenetic polypeptide.
Calcif. Tiss. Res. 21, (Suppl.), 81 - 87 (1976)

96. Urist, M.R., H. Iwata, S.D. Boyd and P.L. Ceccotti:
(a) Observations implicating an extracellular enzymic mechanism of control of bone morphogenesis.
J. Histochem. Cytochem. 22, 88 - 103 (1974)

97. Urist, M.R., J.M. Jurist, F.L. Dubuc and B.S. Strates:
Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits.
Clin. Orthop. 68, 279 - 293 (1970)

98. Urist, M.R., A.J. Mikulski, M. Nakagawa and K. Yen:
(a) A bone matrix calcificationinitiatior non-collagenous protein.
Am. J. Physiol. 232, (3), C 115 - 127 (1977)

99. Urist, M.R., N.F. Earnest, K.M. Kimball, T.P. Di Julio and H. Iwata: Bone morphogenesis in implants of residues of radioisotope labelled bone matrix.
(b) Calcif. Tiss. Res. 15, 269 - 286 (1974)

100. Urist, M.R., R. Granstein, H. Nogami, L. Svenson and R. Murphy: Transmembrane bone morphogenesis across multiplewalled diffusion chambers.
(b) Arch. Surg. 112, 612 - 619 (1977)

101. Urist, M.R., B.F. Silverman, K. Buering, F.L. Dubuc and J.M. Rosenberg: The bone induction principle.
Clin. Orthop. 53, 243 - 283 (1967)

102. Urist, M.R., H. Iwata, P.L. Ceccotti, R.L. Dorfman, S.D. Boyd, R.M. Mc Dowell and C. Chien: Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatine.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3511 - 3515 (1973)

103. Walter, K. und C. Schütt: Alkalische Phosphatase im Serum (fortlaufende Messung)
In: Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse.
2. Aufl., Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1970, Band 1, S. 818 - 826

104. Willenegger, H. und L. Hulliger: Die biologischen Vorgänge im Transplantat und -lager bei autologer, homologer und heterologer Transplantation der verschiedenen Gewebe und Organe (Einbau, Umbau, Stoffwechsel).
Langenbecks Arch. klin. Chir. 308, 955 - 968 (1964)

105. Willis, J.B.: Determitation of metals in blood serum by atomic absorption spectroscopy I. Calcium.
Spectrochem. Acta 16, 259 - 272 (1960)

106. Wlodarski, K., A. Poltorak and J. Koziorowska: Species specifity of osteogenesis induced by wish cell line and bone induction by vaccinia virus transformed human fibroblasts.
Calcif. Tiss. Res. 7, 345 - 352 (1971)

107. Wolter, D., P. Hutzenschreuter, C. Burri und B. Steinhardt: Einbau autologer Spongiosa am Kompaktaknochen in Abhängigkeit von der Vitalität der transplantierten Zellen.
Langenbecks Arch. Chir., Suppl. Chir. Forum 1975, pp 383 - 387 (1975)

108. Young, R.W.: Cell proliferation and specialization during enchondral osteogenesis in young rats.
J. Cell Biol. 14, 357 - 370 (1962)

Lebenslauf

Birgitta Brölz, geb. Miltenberger

2. 3. 1956	Geboren in Waldshut als jüngstes von 3 Kindern des kaufmännischen Angestellten Willi Miltenberger und seiner Frau Cläre, geb. Bohner
1963 – 1966	Besuch der Grundschule in Waldshut
1966 – 1975	Besuch des Hochrhein-Gymnasiums in Waldshut, Abitur
1975 – 1976	Medizinstudium an der Universität Hohenheim (1. – 2. Semester)
1976 – 1981	Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen (3. – 12. Semester), Staatsexamen am 21. 10. 1981
27. 9. 1980	Heirat mit Herrn Rainer Brölz, Diplom-Ingenieur und Regierungsbaumeister aus Baden-Baden